

RÉCHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES
SUR LES LIMONADES ET EAUX GAZEUSES

Université de Montpellier. — Ecole supérieure de pharmacie

N° 117

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES

SUR LES

LIMONADES ET EAUX GAZEUSES

THÈSE

Présentée et publiquement soutenue à l'Ecole Supérieure de Pharmacie de Montpellier

Le **Décembre 1919**

PAR

Marceau FAURE-GEORS

Pharmacien de 1^{re} Classe

Lauréat de l'Ecole supérieure de pharmacie

Prix des Amis de l'Université (Concours 1913)

Ancien chef de laboratoire de toxicologie aux Armées (1915-1919)

Décoré de la Croix de Guerre

Pour obtenir le Diplôme de Docteur de l'Université de Montpellier

(MENTION PHARMACIE)

JURY : { MM. ASTRUC, Professeur, *Président*.
 { TARBOURIECH, Agrégé. } *Assesseurs*.
 { JUILLET, Agrégé. }



MONTPELLIER

IMPRIMERIE « L'ABEILLE » (Coopérative Ouvrière)

14, Avenue de Toulouse. — Téléphone : 8-78

—
1919



ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

ADMINISTRATION

MM. G. MASSOL (*, I. P. ☉)	Directeur.
H. FONZES-DIACON (*, I. P. ☉)	Assesseur.
E. IZARD (I. P. ☉)	Secrétaire.
H. GOT (I. P. ☉)	Secrétaire honoraire.

PROFESSEURS

MM. L. COURCHET (I. P. ☉)	{ Histoire naturelle des médicaments. Botanique.
G. MASSOL (*, I. P. ☉)	Physique appliquée.
Ch. ASTRE (I. P. ☉)	Chimie organique.
H. IMBERT (I. P. ☉)	{ Chimie analytique et Toxicologie.
H. FONZES-DIACON (*, I. P. ☉)	Chimie minérale.
A. ASTRUC (I. P. ☉)	{ Pharmacie galénique et industrielle.

CHARGES DE COURS

MM. P.-J. TARBOURIECH (*, I. P. ☉)	{ Pharmacie chimique. Chimie biologique.
M.-A. FAUCON (A. ☉)	Zoologie pharmaceutique.
A. JUILLET (A. ☉)	{ Matière médicale. Microbiologie. Parasitologie.
CANALS, préparateur	Botanique cryptogamique.
MOYE, prof. Fac. Droit (I. P. ☉) ..	Législation pharmaceutique.

AGRÉGÉS

MM. P.-J. TARBOURIECH (*, I. P. ☉).
A. FAUCON (A. ☉).
A. JUILLET (A. ☉).

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. M.-A. FAUCON (A. ☉)	Physique.
A. JUILLET (A. ☉)	Histoire naturelle.
FARRÉ (A. ☉)	Chimie et Pharmacie.

NOTA. — L'École de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui lui sont présentées.

A MON PÈRE - A MA MÈRE

*Faible l moignage d'inf nie recon-
naissance et de profonde affection.*

A MON FRÈRE

A TOUS MES PARENTS ET AMIS

M. FAURE-GEORS.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ASTRUC

LAURÉAT DE L'INSTITUT

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ GAUCHER

M. FAURE-GEORS.

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ TARBOURIECH
CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A M. LE PROFESSEUR AGRÉGÉ JUILLET

M. FAURE-GEORS.

Avant d'exposer notre travail, nous voulons exprimer notre reconnaissance à M. le professeur agrégé Gaucher, qui nous a initié à la bactériologie et dirigé dans l'étude de cette science. Pendant les années où dans son laboratoire nous avons eu l'honneur de travailler à ses côtés il nous a toujours prodigué ses conseils éclairés et l'appui de son expérience ; nous n'oublierons pas la bienveillance qu'il n'a cessé de nous témoigner et nous lui gardons à jamais notre profonde gratitude.

M. le professeur Astruc a bien voulu accepter la présidence de notre thèse ; nous le remercions sincèrement de l'honneur qu'il nous a fait et nous le prions d'agréer notre respectueuse reconnaissance.

Avec joie nous saisissons l'occasion qui nous est offerte d'exprimer notre gratitude à M. le professeur agrégé Juillet auprès de qui nous avons toujours trouvé le meilleur accueil ; il a bien voulu nous diriger dans les recherches que nous avons effectuées en 1919 et c'est grâce à lui que nous avons pu conduire notre travail à bonne fin.

A M. le professeur Tarbouriech va notre respectueuse sympathie et tous nos remerciements pour l'honneur et le plaisir qu'il nous a fait en acceptant de faire partie de notre jury.

Nous nous souvenons avec plaisir de nos compagnons

X

*d'études avec qui nous avons vécu de si belles années,
mais nous ne saurions oublier les excellents camarades
du groupe de brancardiers de la 58^e D. I. dont l'amitié
nous fut si précieuse pendant les quatre années que nous
avons passées dans cette unité.*

RECHERCHES BACTÉRIOLOGIQUES

SUR LES

LIMONADES ET EAUX GAZEUSES

INTRODUCTION

Rafrâichissantes et agréables au goût, les boissons gazeuses jouissent, pendant l'été, d'une faveur spéciale dans le Midi de la France; eaux de Seltz et limonades sont livrées à la consommation d'une façon ininterrompue pendant toute la saison chaude. Il nous a paru intéressant et utile d'étudier la flore microbienne pour nous assurer si ces boissons ne renfermaient pas d'organismes nuisibles et pouvaient être absorbées impunément.

L'eau ordinaire, employée pour leur fabrication, peut servir de véhicule à divers microbes saprophytes et pathogènes; elle peut être contaminée accidentellement par des bactéries dangereuses, telles l'Eberth ou le Coli, et il n'est pas indifférent de connaître la façon dont ces microbes peuvent se comporter dans le milieu assez complexe des limonades, et dans celui plus simple des eaux de Seltz.

Déjà dans l'eau ordinaire la manière de vivre des mi-

crobes dépend d'un certain nombre de conditions : la composition chimique de l'eau, sa teneur en matières organiques, la nature de ces matières organiques, la température, l'aération, etc. Dans les boissons que nous étudions viennent s'ajouter d'autres facteurs : l'action de l'acide carbonique associée à la pression, l'acidité du milieu et sa composition essentiellement riche en matières sucrées.

Les eaux de Seltz, obtenues industriellement par dissolution dans l'eau d'acide carbonique sous pression, constituent un milieu de culture assez simple ; ce milieu est beaucoup plus complexe chez les limonades préparées par dilution de sirops et saturation d'acide carbonique. Et alors les microbes vont-ils trouver ici un terrain défavorable de par sa réaction acide et la pression du liquide, ou pourront-ils se développer et pulluler grâce aux substances ternaires nécessaires à leur nutrition : les sucres et l'acide tartrique.

L'action sur les bactéries de l'acide carbonique, de la pression, des acides tartrique et citrique a été longuement étudiée, mais les résultats des expériences ne sont pas concordants ; cela tient probablement à ce que les conditions d'expériences n'étaient pas identiques, les espèces étudiées n'avaient pas le même degré de virulence, les milieux de culture différaient.

C'est ainsi que certains auteurs considèrent comme très faibles les propriétés antiseptiques de l'acide carbonique qui, s'il est capable de détruire certains micro-organismes, en laisse pulluler d'autres.

FRAENKEL (1888) considère que l'acide carbonique n'empêcherait en rien le développement de l'Eberth.

ALTANA (1907) lui reconnaît une action énergique puisque d'après lui, dans ce gaz pur, le Coli et l'Eberth pousse-

raient mal et lentement, tandis que le B. de Lœfler, le vibron cholérique ne se développeraient pas.

D'ARSONVAL et CHARRIN (1893, p. 532) citent l'opinion d'Arnaud et Charrin qui estiment que l'acide carbonique est contraire au B. pyocyannique, lequel cultive avec peine dans ce milieu.

La pression agit peu sur la vitalité des microbes, qui peuvent supporter des pressions très élevées sans présenter des modifications appréciables dans leurs propriétés. Le B. pyocyannique soumis par D'ARSONVAL et CHARRIN (1893) à une pression de 50 atmosphères sous l'acide carbonique aurait, après six heures de traitement, perdu son pouvoir chromogène et tout pouvoir de reproduction, au bout d'une journée, le bacille était complètement détruit; mais, dans ce cas, il est possible que le résultat soit dû à l'action combinée de la pression et de l'acide carbonique.

Les acides tartrique et citrique ont un pouvoir antiseptique et un pouvoir bactéricide très net. MACÉ (1913, p. 92) les classe parmi les substances fortement antiseptiques, puisque pouvant déjà à la dose de 3 grammes empêcher la putréfaction d'un bouillon de bœuf neutralisé, puis exposé à l'air.

Leur pouvoir microbicide a été étudié par ABBOTT (1866), qui a constaté que l'acide tartrique à la dose de 1/400 tuait au bout de deux heures les microbes qu'on immergeait dans sa solution. MIQUEL (1884, p. 94) admet son pouvoir infertilisant à la dose de 1/200.

Quant à l'acide citrique, son action se fait sentir à la dose de 1/230 vis-à-vis du B. d'Eberth, qu'il tue, d'après KITASATO (1888), après cinq heures de contact, et vis-à-vis du V. cholérique qu'il détruit à la dose de 1/330. Résultat confirmé par les expériences de VAN ERMENGER (1885),

qui a réussi à tuer le *B. cholérique* en demi-heure avec une solution d'acide citrique à 1/200.

Les facteurs que nous venons d'envisager auraient donc, au point de vue général, une influence plutôt défavorable sur la vitalité des microbes ; mais, dans les boissons gazeuses, la pression est-elle suffisante, les quantités d'acide carbonique, tartrique ou citrique, sont-elles assez élevées pour annihiler complètement ou partiellement la vie des bactéries pathogènes ou saprophytes ?

D'autre part, il ne faut pas oublier que le sucre provenant du sirop qui a servi à édulcorer les limonades constitue un milieu de culture éminemment propre à assurer la nutrition des microbes.

Le saccharose est un aliment de choix pour les bactéries qui, pour en vivre, doivent le transformer en sucre interverti, mélange de glucose et de lévulose. Or les limonades contiennent toujours avec le saccharose une quantité variable de sucre interverti, quantité d'autant plus grande que la boisson est plus anciennement préparée, résultat dû à ce que les acides tartrique ou citrique, à la température ordinaire, provoquent une inversion progressive et assez rapide du sucre de canne ; la quantité de glucose et de lévulose peut même, au bout d'un certain temps, dépasser celle du saccharose restant.

Nous avons, d'ailleurs, suivi la rapidité de cette inversion dans un échantillon renfermé dans un flacon bien bouché et conservé à 15°, température de laboratoire ; les dosages effectués avec la liqueur de Fehling ont été pratiqués de suite après la préparation de la limonade, puis de deux semaines en deux semaines. Après la préparation, l'échantillon renfermait déjà, par litre, 2 gr. 03 de sucre interverti ; au bout de 12 semaines, il en conte-

nait 23 gr. 85 et l'inversion continuait pour atteindre 46,73 après 18 semaines.

Les résultats obtenus sont d'ailleurs les suivants :

		Glucose par litre
Après la préparation.....		2 gr. 03
5 semaines après la préparation...		9 gr. 80
7 — — — — —		13 gr. 50
12 — — — — —		23 gr. 85
14 — — — — —		34 gr. 25
16 — — — — —		41 gr. 66
18 — — — — —		46 gr. 73

L'édulcoration étant due à 78 grammes de saccharose, on voit donc qu'au bout de 16 semaines, plus de la moitié, exactement 39 gr. 57, ont été transformés pour donner 41 gr. 66 de sucre réducteur.

Cette modification dans la composition du milieu n'est pas la seule, il s'en produit d'autres par actions réciproques des divers éléments de l'eau, des acides, de sorte que les limonades sont le siège de transformations, d'altérations continues.

Enfin, outre la nature du milieu, il faut tenir compte de la lutte des microbes entre eux, certaines espèces pouvant s'assurer la prédominance et devenir malfaisantes. On peut donc se demander si la flore des limonades et eaux gazeuses ne contient pas de bactéries pathogènes, et si, préparées avec de l'eau contaminée accidentellement par le colibacille ou l'Eberth, elles ne deviendraient pas un danger pour la santé publique. Nous avons pensé que cette étude pouvait être suffisamment utile pour l'aborder comme sujet de notre thèse.

Nous avons adopté dans notre travail l'ordre suivant :

1° L'historique de la fabrication des boissons gazeuses.

2° Les méthodes d'analyses que nous avons employées dans nos recherches pendant l'année 1913-14 et en 1919.

3° Les résultats des analyses bactériologiques avec un addendum où sont décrites toutes les espèces non identifiées et les espèces connues mais à caractères spéciaux.

4° L'étude expérimentale du colibacille et du B. d'Eberth dans les limonades et eaux gazeuses.

5° Les conclusions.

HISTORIQUE ET FABRICATION INDUSTRIELLE

L'origine de la fabrication des eaux gazeuses qui remonte au XVIII^e siècle a été l'imitation des eaux minérales naturelles. On croyait que le gaz qui se trouvait dans ces eaux et leur communiquait une « saveur fraîche, agréable, piquante et salubre » était de l'air condensé, et qu'en dissolvant dans de l'eau ordinaire des matières capables d'y produire une effervescence, on obtiendrait une boisson présentant les mêmes propriétés que les eaux minérales.

Après la découverte de l'acide carbonique en 1648 par VAN HELMONT, on constata la présence de cet acide dans toutes les eaux minérales ; en même temps on acquérait sur l'analyse de ces eaux des connaissances assez étendues, qui permettaient d'en déterminer la composition ; l'idée fut alors émise qu'en dissolvant dans une eau potable les principes décelés par l'analyse, on obtiendrait une solution identique au liquide naturel, et des méthodes de préparation furent indiquées.

Mais ce n'est qu'en 1779 qu'un auteur français, DUCHANÔY, donna un procédé de fabrication des eaux minérales artificielles où il indiquait un mode de prépara-

tion de l'acide carbonique par l'action de l'acide sulfurique sur la craie et sa dissolution dans de l'eau avec différents sels.

L'eau de Seltz, c'est-à-dire l'eau tout simplement gazeuse, ne fut fabriquée qu'en 1788 par deux pharmaciens de Genève, PAUL et GASSE, qui avaient inventé un appareil intermittent : L'acide carbonique était obtenu en faisant agir de l'acide sulfurique sur de la craie ; il passait dans des flacons laveurs où il se débarrassait de ses impuretés, en particulier des traces de SO^4H^2 entraînées, et se rendait dans un gazomètre où on l'emmagasinait ; il était ensuite refoulé dans un saturateur, récipient rempli d'eau dans laquelle il se dissolvait, et l'eau ainsi saturée était mise en bouteille.

Des modifications furent ultérieurement apportées au procédé qui offrait l'inconvénient, que la quantité de gaz dissous s'affaiblissait au fur et à mesure que le tirage augmentait ; des industriels fabriquèrent des appareils plus perfectionnés, ce furent les appareils d'OZOUF, puis ceux de l'ingénieur français MONDALLOT qui produisit le CO^2 d'une manière industrielle et automatique.

Actuellement la fabrication de l'eau gazeuse se fait suivant le même principe : dissolution dans l'eau d'acide carbonique sous pression, en suivant une technique que nous allons indiquer.

Livrée à la consommation dans des siphons elle est dénommée *Eau de Seltz* ; édulcorée avec des sirops spéciaux et aromatisée avec des essences diverses, elle constitue la *Limonade* conservée en flacons capsulés de 300 à 600 cc. environ de capacité.

PRÉPARATION INDUSTRIELLE DE L'EAU GAZEUSE. — La gazéification de l'eau peut être obtenue avec de l'acide

carbonique préparé extemporanément à l'usine au moment du besoin, ou avec du CO_2 liquide maintenu sous pression dans des obus de dimensions variables ; mais, dans les deux cas, la qualité de cet acide pas plus que celle de l'eau à employer ne sont indifférentes et nous allons indiquer les conditions auxquelles ils doivent répondre l'un et l'autre.

Qualité de l'eau. — Elle doit être bactériologiquement pure et posséder tous les caractères chimiques d'une eau potable. Or les eaux susceptibles d'être employées pour la consommation appartiennent aux catégories suivantes : 1° eaux de rivière ; 2° eaux de puits ; 3° eaux de citerne ; 4° eaux de pluie ; 5° eaux de source. Leur valeur est bien différente ; seules les dernières sont d'ordinaire d'une pureté relative et il est facile de les obtenir parfaitement pures, en prenant des précautions pour éviter leur souillure par le sol à leur point d'émergence, et leur contamination dans des tuyaux fissurés.

L'eau de pluie ne doit pas être recueillie pendant la première ondée, les premières eaux tombées étant fortement contaminées par les nombreux microorganismes de l'atmosphère ; il est d'ailleurs utile de pouvoir recouvrir le récipient qui a collecté l'eau, dès que la pluie a cessé, pour éviter que les poussières atmosphériques ne viennent s'y accumuler ; il faut enfin disposer le collecteur de façon à empêcher que la pluie, en tombant sur le sol, ne fasse rejaillir à l'intérieur des gouttes d'eau boueuse qui contamineraient le liquide récolté.

Les puits doivent être surveillés, car la contamination par infiltration des eaux de déchets ou des liquides provenant des fosses d'aisance est d'autant plus facile que le terrain est plus perméable ; il est donc nécessaire

qu'ils soient installés loin des maisons d'habitation, des fosses d'aisances, avec un large périmètre de protection.

Les citernes, parfaitement curées et protégées contre les contaminations accidentelles, ont besoin d'être ventilées pour empêcher le développement des champignons et des algues. Quant aux eaux de rivière, il faut autant que possible les rejeter de l'alimentation, leur composition chimique et leur teneur microbienne étant sujettes à de trop nombreuses variations grâce aux crues et à l'apport des eaux d'égouts dans la traversée des villes.

En somme, les eaux de rivière, de citerne et de puits, en raison de l'extrême facilité de leur contamination, doivent toujours être suspectées ; elles ne peuvent être employées qu'avec précaution et une filtration scrupuleuse.

Au lieu d'employer l'eau ordinaire comme on le fait d'habitude, WILLIERS, COLIN et FAYOLLE (p. 105) estiment, d'après leurs propres termes, « qu'il serait peut-être préférable d'employer des eaux naturelles fortement carbonatées, alcalines, ou même de préparer artificiellement ces eaux alcalines, en dissolvant dans l'eau carbonique de 25 à 50 centigr. de carbonate terreux par litre ; cette addition aurait en effet l'avantage d'empêcher en partie le dégagement total et brusque du gaz au moment où l'eau est versée ».

Quelle que soit son origine, l'eau destinée à être gazéifiée doit toujours être filtrée avant de se rendre dans le réservoir où elle séjourne pour être ensuite aspirée et refoulée par une pompe dans le « saturateur » où elle se trouvera en contact avec l'acide carbonique.

Filtration. — Elle s'effectue avec différents types de filtres :

1° Filtre fonctionnant par aspiration : Constitué par

une caisse métallique à fond perforé et remplie par des lits d'éponges fortement tassées et de charbon ; il est employé quand on n'a pas d'eau sous pression.

Il est nécessaire de nettoyer fréquemment les matières filtrantes par lavage à grande eau, après les avoir sorties du réservoir.

2° Filtre fonctionnant par pression : La matière filtrante est encore constituée par des lits d'éponges et de charbon disposés dans une caisse en fonte ; l'eau arrive par une ouverture à la partie inférieure et s'échappe par une tubulure placée au centre de l'appareil, après avoir traversé les couches filtrantes. Le nettoyage très simple consiste à établir un contre-courant d'eau.

3° Filtre Berkefield à grand débit : Ne peut être employé qu'avec pression et se trouve aujourd'hui dans la plupart des fabriques d'eau gazeuse. Il est constitué par un récipient métallique pourvu d'un couvercle qu'on fixe par des vis à oreille ; à l'intérieur, disposées circulairement, se trouvent des bougies en nombre variable (généralement 15 bougies suffisent) qui sont suspendues à un plateau perforé ; deux rondelles en caoutchouc placées dans des rainures sur le bord du plateau et du récipient rendent la fermeture hermétique. Le robinet d'arrivée, situé latéralement à la partie supérieure du récipient, est relié à la conduite d'eau ou à la pompe par un tuyau de plomb ; l'eau filtrée ne peut sortir que par un tuyau qui prend naissance au milieu du couvercle ; enfin un robinet placé à la base de l'appareil sert de vidange.

Les bougies doivent être nettoyées soigneusement et fréquemment car « les meilleures couches filtrantes elles-mêmes peuvent ne plus agir suffisamment au bout d'un certain temps d'usage » (Macé, 1913, p. 783) et les bacté-

ries, même les moisissures, peuvent passer à travers les pores et se retrouver intactes dans l'eau filtrée.

Qualité de l'acide carbonique.— L'acide carbonique employé est généralement du CO^2 liquide que le fabricant de limonade se procure facilement dans le commerce; mais il est aussi parfois fabriqué extemporanément à l'usine avec un appareil intermittent, lorsque l'acide carbonique liquide vient à manquer.

Le CO^2 est alors obtenu en faisant agir de l'acide sulfurique sur du carbonate de chaux (craie ou marbre) ou sur du bicarbonate de soude; dans le premier cas, la réaction donne naissance, en même temps qu'au CO^2 , à du SO^4Ca qui peu soluble se dépose, encrasse l'appareil générateur, d'où nécessité de nettoyages fréquents; tandis qu'avec le CO^3NaH le sous-produit formé est du SO^4Na^2 qui, soluble, est retiré facilement avec l'eau qui a servi à charger l'appareil. C'est là un détail qui a son importance pratique pour l'industriel.

Le CO^2 qui a pris naissance contient des impuretés : des traces de SO^4H^2 d' HCl dont il se débarrasse par son passage à travers un laveur à eau, et en définitive on obtient un gaz à peu près pur que l'on recueille dans un gazomètre.

Principe de la fabrication. — L'eau, après filtration, s'est rendue dans un réservoir pourvu d'un régulateur qui ferme le tube d'admission de l'eau quand le récipient est plein; l'acide carbonique a été emmagasiné dans le gazomètre. Les deux réservoirs sont en communication avec une pompe qui aspire en même temps l'eau et le gaz, et les refoule dans le saturateur suivant des proportions qu'on peut régler par un robinet de distribution.

Le saturateur est constitué par un « tonnelet » en cuivre, argenté intérieurement et pourvu d'un agitateur à ailettes

qui effectue un brassage énergique des deux produits en contact et assure la dissolution de l'acide carbonique dans l'eau ; il porte extérieurement un manomètre qui indique la pression, la gazéification de l'eau pour limonade se faisant à une pression de 4 atmosphères, tandis que celle des siphons se fait à 8 ou 10 atmosphères. Il ne reste plus qu'à effectuer le remplissage des bouteilles et des siphons, grâce à un appareil de tirage qui est en communication avec le saturateur.

Quand il s'agit d'un siphon, on l'introduit dans une enceinte grillagée, une cuirasse, qui protège l'ouvrier manipulateur en cas de bris du récipient ; le siphon est placé renversé sur un godet qui surmonte une tige pourvue inférieurement d'une pédale, et c'est en appuyant sur cette pédale qu'on amène le bec du siphon à s'adapter au tuyau d'arrivée de l'eau gazeuse. D'autre part, grâce à un levier, on ouvre le siphon, tandis qu'en appuyant fortement et vivement sur un deuxième levier, on ouvre le robinet de tirage et le siphon se remplit.

Pour les limonades, avant de procéder au tirage de l'eau gazée, on distribue dans chaque flacon une dose déterminée de sirop ; ce sirop se fait soit à chaud, soit à froid avec un appareil continu en se servant de sucre blanc, cristallisé ou en morceaux ; il est acidulé avec de l'acide citrique ou tartrique et aromatisé avec de l'essence de citron ou avec de l'alcoolat de citron ou d'orange.

WILLIERS, COLIN et FAYOLLE donnent dans leur *Traité des falsifications des substances alimentaires* (p. 149) deux formules de sirop pour limonades que nous transcrivons :

Sirop pour limonade ordinaire : *Sirop pour limonade fine*

Sucre blanc.....	50 kil.	Sucre blanc.....	50 kil.
Acide tartrique...	0 k. 600	Acide citrique....	0 k. 200
Alcoolat de citron		Acide tartrique...	0 k. 500
concentré.....	60 centil.	Alcoolat de citron	
Eau	29 litres	concentré.....	75 centil.
		Eau	29 litres

Le sirop ainsi préparé est réparti dans les flacons, généralement à raison de 80 à 100 gr. environ par litre, et l'on procède alors au remplissage et au ficelage des bouteilles.

Le tirage s'opère en plaçant la bouteille sur un support en bois que l'on peut soulever à volonté en appuyant avec le pied sur une pédale.

De cette façon on amène le goulot de la bouteille en contact avec un petit entonnoir garni de caoutchouc : c'est le cône d'embouteillage qui contient à sa partie supérieure un bouchon qu'on fait descendre à l'aide d'un levier pour l'amener un peu au-dessus du trou d'arrivée de l'eau gazeuse dans le cône ; on ouvre alors le robinet de tirage et la bouteille s'emplit. Lorsqu'elle est pleine, on ferme le robinet de tirage, on enfonce le bouchon dans le goulot, puis on descend la bouteille en abaissant la pédale qui la supporte et on ficelle.

Actuellement le bouchage est surtout obtenu avec une capsule de métal, en fer blanc étamé ou en aluminium, munie intérieurement d'un disque de liège ; il s'effectue avec une machine à pédale, une machine à force motrice ou une rotative automatique suivant le même principe : On introduit la capsule dans un anneau dit « anneau de gorge » pourvu de crampons automatiques qui agrippent cette capsule. La bouteille, disposée sur le plateau, est

soulevée soit automatiquement, soit en appuyant avec le pied sur la pédale, son goulot s'engage dans l'anneau de gorge et la fermeture s'effectue par suite de la pression qui en résulte.

La limonade est dès lors prête à être livrée à la consommation.

MÉTHODES D'ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE

L'analyse bactériologique d'une eau doit déterminer le nombre total des germes vivants contenus dans un volume donné de l'échantillon examiné (numération des germes totaux); elle doit séparer et caractériser les diverses espèces microbiennes, s'attachant surtout à la recherche et à la numération du colibacille au litre d'eau (colimétrie): il faut enfin qu'elle indique la façon dont se comportent les animaux de laboratoire soumis à l'action des diverses espèces de bactéries que l'on peut supposer être nocives (essai biologique).

C'est en nous basant sur ces considérations que nous avons effectué nos recherches analytiques sur les limonades et eaux gazeuses. Nous avons d'abord été préoccupé par la recherche du colibacille dont la présence dans l'eau constitue un élément important, capital même, d'appréciation, une eau souillée renfermant le coli en proportion élevée (d'après VINCENT: eau suspecte 100 à 1000 coli par litre; eau mauvaise ou très mauvaise > 1000 coli par litre), tandis que, lorsqu'il existe dans une eau potable, on ne l'y trouve qu'en très minime quantité. Nous avons déterminé le nombre des germes aérobies (d'après les cultures sur gélatine) contenus

dans un centimètre cube de l'échantillon examiné, notant le nombre de moisissures, le nombre d'espèces liquéfiantes et celui des espèces non liquéfiantes, car « le nombre des espèces, écrit G. ROUX (1892, p. 263) est beaucoup plus important que celui des colonies contenues dans 1 cc. pour l'appréciation biologique de l'eau potable... Si on trouve plus de dix espèces dans 1 cc. d'eau on doit admettre que cette eau est plus ou moins contaminée ». Nous ne nous sommes pas contenté de la numération des germes et nous avons isolé les bactéries en cultures pures pour étudier leurs caractères microscopiques, leurs propriétés biologiques et essayer de les identifier. Enfin dans chaque analyse l'essai physiologique a été tenté sur un cobaye, qui chaque jour a été examiné et pesé de semaine en semaine.

Nos recherches ont porté surtout sur les aérobies, cependant nous avons essayé de déceler la présence de microbes anaérobies, car, comme l'écrit Vincent (1905, p. 233) « il ne faut pas séparer de l'expertise bactériologique des eaux, les divers éléments d'appréciation que l'on peut tirer à la fois du nombre de *B. coli* qu'elle renferme, de la présence des microbes de la putréfaction, enfin de celle des *M. anaérobies stricts*, toujours d'autant plus nombreux que l'eau est plus adultérée ». Tandis que dans une eau de bonne qualité leur nombre s'élève au plus à quelques unités par cc. ou parfois même peut être nul, dans les eaux adultérées l'ensemencement peut déceler 5, 10, 20, 30 germes anaérobies par cc., leur proportion étant, d'après Vincent « en raison directe du nombre de *M. aérobies*, mais toujours cependant beaucoup plus faible ».

TECHNIQUE

Procédés de numération suivis en 1913-1914.

La méthode appliquée est celle des plaques de gélatine :
On prépare 2 flacons contenant 99 cc. d'eau distillée.
On prépare 2 flacons contenant 90 cc. d'eau distillée.
On les stérilise à l'autoclave à 115° pendant 1/4 d'heure.

On dispose 6 boîtes de Pétri stériles qu'on étiquette par couple 1, 2, 3 ; puis, au moment opportun, on fait fondre au bain-marie et on ramène, à 35° ou 40°, 3 tubes de gélatine stérile.

On fait des dilutions au 1/100 et au 1/10 de l'eau analysée, en versant avec une pipette aseptique 1 cc. dans les 2 flacons à 99 cc. d'eau distillée stérile et 10 cc. dans les 2 autres flacons ; on agite et on ensemence :

Pour cela, verser :

Dans les deux boîtes n° 1. 1 cc. de la dilution au 1/100.

Dans les deux boîtes n° 2. 1 cc. de la dilution au 1/10.

Dans les deux boîtes n° 3. 1 cc. eau nature.

Puis laisser couler avec les précautions d'usage dans chaque boîte entre-bâillée le contenu d'un tube de gélatine ; mélanger exactement en balançant doucement la boîte et laisser refroidir jusqu'à solidification complète de la gélatine, après avoir posé les boîtes sur une lame de verre recouverte ou non d'une feuille de papier filtre mouillée ; porter à l'étuve à 20° ou, en été, abandonner à la température du laboratoire, ayant soin de disposer les boîtes renversées, le couvercle en bas, pour que, s'il y a liquéfaction, elle ne puisse s'étendre, la gélatine liquéfiée tombant sur le couvercle.

Dès le deuxième jour qui suit l'ensemencement, les boîtes sont examinées de 24 en 24 heures; on les dispose sur un fond noir et on compte les colonies qui ont apparu en les marquant avec un trait à l'encre. On note le nombre des moisissures, celui des germes liquéfiantes et aussi celui des espèces. Les numérations doivent être poursuivies jusqu'au 15^e jour, puisqu'il est admis que, jusqu'à cette époque, des colonies nouvelles peuvent apparaître.

Procédés de numération suivis en 1919.

Ce sont les mêmes que ceux qui ont été employés pendant l'année 1913-1914 et qui viennent d'être décrits.

Calculs. — Les chiffres obtenus dans les numérations sont multipliés par :

100 pour chacune des boîtes n° 1 (dilution au 1 p. 100);

10 pour chacune des boîtes n° 2 (dilution au 1 p. 10).

Les boîtes n° 3 donnent directement le nombre de colonies au centimètre cube, mais pour avoir avec plus d'exactitude le nombre réel des germes existants par centimètre cube on prend la moyenne des résultats donnés par les 6 boîtes. Si la liquéfaction totale de la gélatine empêche la numération des colonies, il faut spécifier le jour où a été faite la dernière numération; on peut encore ramener le chiffre trouvé au chiffre total après 15 jours, en utilisant le tableau de MIQUEL ou celui de VINCENT.

Caractérisation. — Les boîtes de Pétri présentent des colonies isolées les unes des autres dont on note les aspects, dimensions, colorations et dont on suit les modifications journallement.

On repique ces colonies en tubes de bouillon peptoné

où les bactéries se développent en modifiant diversement le milieu : production de trouble, de coloration, de voile, de dépôt, et l'on se sert ensuite de ce bouillon pour faire des cultures sur plaques de gélatine, en piqûre sur gélatine en tube, en strie sur gélose, et dans le lait. Sauf pour la gélatine conservée à 20°, ces divers milieux sont placés à l'étuve à 37° et examinés chaque jour, leurs modifications étant enregistrées avec soin.

Ces diverses déterminations sont insuffisantes pour une caractérisation d'espèce ; il est nécessaire de les compléter par des réactions biologiques faites sur des milieux spéciaux. On recherche l'action fermentative du microbe sur les sucres ; il peut, en effet, faire fermenter le glucose et le maltose, mais laisser intact les autres sucres, notamment le lévulose ; on s'en rend compte par les cultures en milieux sucrés tournesolés et au neutral-roth.

On détermine s'il n'y a pas d'action protéolytique, auquel cas le microbe provoque la peptonisation du blanc d'œuf, de la gélatine solidifiée, du sérum coagulé.

On recherche le pouvoir bactériolytique, le pouvoir hémolytique. On fait enfin des cultures sur milieux spéciaux (métalliques ou organiques) dont on note toutes les modifications.

Enfin les microbes sont observés au microscope à l'état vivant, puis sur des préparations fixées et colorées toujours soumises à l'action du liquide de Lugol (méthode de Gram).

C'est en suivant cette technique que nous avons essayé d'identifier les microbes qui constituent la flore des limonades et des siphons ; certaines espèces ont été nettement caractérisées, pour d'autres la détermination exacte n'a pu être faite d'une façon catégorique, et c'est pourquoi nous décrivons leurs caractères biologiques, en

indiquant de quelle espèce connue chacune d'elles se rapproche le plus.

Enfin, quelques microbes, qui n'ont pu être assimilés à aucune des espèces décrites dans les traités, ont fait l'objet d'un sous-chapitre ; *ce ne sont pas des espèces nouvelles*, ce sont des espèces que nous n'avons pas pu caractériser ; nous donnons tous leurs caractères morphologiques et biologiques, afin que leur existence soit connue dans le cas où l'étude bactériologique des boissons gazeuses serait reprise et faite d'une façon beaucoup plus complète que dans notre modeste travail.

Colimétrie. — Procédés suivis en 1913-1914.

La recherche du coli a été faite en se basant sur le fait que le coli se développe bien en milieu phéniqué à la température de 42°, alors que les autres microbes ne poussent pas ou sont gênés dans ces conditions.

Pour chaque analyse on prépare :

20 tubes contenant chacun 10 cc. de bouillon peptoné phéniqué à la dose de 0,85 p. 1000.

4 ballons avec 10 cc., 20 cc., 50 cc., 100 cc. de bouillon phéniqué.

Avec une pipette stérile donnant 20 gouttes au centimètre cube, on ensemence une goutte d'eau dans chacun des 20 tubes, puis, dans chaque ballon, on ensemence une quantité d'eau correspondant à la quantité de bouillon, c'est-à-dire 10 cc., 20 cc., 50 cc., 100 cc. et on porte le tout à l'étuve à 42°. Au bout de 16 ou 18 heures, la présence du colibacille se manifeste par un trouble sans formation de voile.

Dans nos recherches sur les limonades, nous avons

été gêné par la présence du *B. subtilis* qui a poussé fréquemment dans les ballons et que nous avons éliminé difficilement; le *B. mesentericus vulgatus* s'est également quelquefois développé dans notre bouillon phéniqué.

Il est donc nécessaire, pour isoler le colibacille, de repiquer sur bouillon phéniqué 2 ou 3 fois à 6 ou 8 heures d'intervalle; en dernier lieu, on repique sur bouillon ordinaire dont on se sert pour ensemençer les divers milieux qui servent à caractériser le microbe.

Procédés suivis en 1919.

L'isolement et la numération du colibacille ont été réalisés par la méthode de Vincent qui donne des résultats très constants.

Méthode de Vincent. — Cette méthode utilise des propriétés biologiques du colibacille : possibilité de le cultiver en milieu phéniqué et adaptation du germe à des températures relativement élevées, 41°-42°, conditions qui empêcheraient ou gêneraient le développement de bactéries associées au colibacille.

On prépare pour chaque analyse :

1° 5 tubes contenant chacun 10 cc. d'eau peptonée et 2 tubes avec 20 cc. de ce même milieu.

2° Une solution peptonée, salée, concentrée et stérile, obtenue avec :

Peptone.....	50 gr.
Chlorure de sodium..	25 gr.
Eau.....	100 gr.

3° Une solution d'acide phénique à 5 p. 100, stérile.

4° 5 ballons stériles étendus de 250 cc.

2 pipettes de 1 cc. ou de 2 cc. graduées en $1/20$ de cc.

1 pipette de 10 cc., 1 de 20 cc., 1 de 50 cc.

1 pipette donnant XXX gouttes au centimètre cube.

On ensemence avec l'eau à analyser et à doses croissantes en opérant de la façon suivante :

Dans 5 tubes contenant 10 cc. d'eau peptonée, verser en mesurant exactement avec une pipette graduée et stérile et avec toutes les précautions d'usage 0,05, 0,10, 0,25, 0,50, 1 cc. d'eau ; ensemencer ainsi avec 2 cc. et 5 cc. d'eau les tubes contenant 20 cc. d'eau peptonée.

Les ballons reçoivent successivement 10, 20, 50, 100 et 200 cc. d'eau à analyser.

En général ces volumes donnent des renseignements suffisants ; on pourrait augmenter les dilutions ou augmenter les volumes d'eau ensemencée dans les ballons si on voulait pousser plus avant les recherches.

Ajouter alors aux ballons une quantité suffisante d'eau peptonée concentrée, pour obtenir une dilution de de peptone au $1/100$.

Soit : 0,2 cc. pour 10 cc. d'eau.

— 0,4 cc. — 20 cc. — etc.

Ces volumes sont mesurés avec une pipette graduée de $1/10$ de centimètre cube. Verser dans chaque ballon ou tube une quantité suffisante d'eau phéniquée pour obtenir une dilution à 0,85 p. 1000. Opérer avec la pipette jaugée à XXX gouttes au centimètre cube, soit :

1 goutte de la solution d'acide phénique à $5/100$ par 2 cc.

On mélange soigneusement et on porte à l'étuve à $41^{\circ}5$ pendant quatorze à seize heures.

On peut d'ailleurs phéniquer en bloc l'eau peptonée avant de la répartir en tubes et de la stériliser ; il suffit

d'ajouter à un litre d'eau peptonée 17 cc. de la solution à 5 p. 100 d'acide phénique.

La présence du colibacille est exprimée dans les tubes ou dans les ballons par un trouble uniforme avec ondes moirées quand on agite légèrement le tube ; il n'existe pas de voile. D'autres germes peuvent se développer en même temps (*Bacillus subtilis* ou *mesentericus* ; mais leur présence est beaucoup moins fréquente que dans le bouillon peptoné phéniqué qui constitue un milieu de culture plus riche et plus favorable au développement de ces germes.)

Caractérisation. — On examine une goutte de culture et on fait une coloration par la méthode de Gram. Si le germe observé présente les caractères morphologiques et de coloration du colibacille (bacille ou coccobacille, ne prenant pas le Gram, non sporulé), on repique en eau peptonée phéniquée trois fois de suite à quatre ou cinq heures d'intervalle, faisant un dernier repiquage sur bouillon ordinaire, et avec la culture ainsi obtenue on ensemence successivement le germe isolé sur milieu lactosé carbonaté, lait tournesolé, milieu de Endo, milieu au rouge neutre, milieu au plomb, et eau peptonée ordinaire (pour la recherche de l'indol). On vérifiera ainsi les caractères biologiques et on se rendra compte s'ils sont identiques à ceux du coli, qui sont les suivants :

1° En milieu lactosé carbonaté, production d'un dégagement gazeux ; le coli fait en effet fermenter le lactose et l'acide lactique produit déplace le CO_2 du carbonate.

2° Le lait tournesolé est coagulé et prend une teinte rouge sous l'influence de l'acide lactique formé.

3° Sur milieu de Endo fortement reCOLORÉ en rouge apparaissent des colonies à reflets moirés caractéristiques. La technique de choix est celle préconisée par

Reuben L. Kahn, qui consiste, lorsqu'on prépare le milieu de Endo, à le couler en tubes comme pour la gélose inclinée; l'ensemencement se fait avec le fil de platine, en piqûre dans la masse gélosée et en surface. De cette façon, lorsqu'il s'agit du coli, on observe un dégagement gazeux dans les parties profondes du milieu, dégagement parfois assez intense pour contracter la gélose de Endo et la chasser vers la partie supérieure du tube. Les colonies à reflets moirés qu'on peut observer à la surface du milieu et sa coloration rouge sont caractéristiques.

4° Sur milieu au rouge neutre, le coli provoque la décoloration et l'apparition d'une fluorescence bien nette.

5° Sur milieu au plomb, à part quelques exceptions, il ne noircit pas.

6° En eau peptonée ordinaire, il y a production d'indol. Voici les deux techniques que nous avons employées pour la recherche de l'indol et qui nous ont donné de bons résultats :

a) A 10 cc. de culture en eau peptonée phéniquée datant de 24 ou 48 heures, ajouter 1 cc. d'alcool amylique, puis verser quelques gouttes d'acide azotique nitreux. Agiter. Laisser reposer. S'il y a eu production d'indol, l'alcool amylique qui vient surnager le liquide possède une belle teinte rose.

Cette méthode très pratique a l'avantage d'être instantanée. A défaut d'alcool amylique, nous avons employé la réaction de Salkowsky opérant de la façon suivante :

b) A 10 cc. de culture en eau peptonée phéniquée, datant de 24 ou 48 heures, on ajoute :

1 cc. solution de nitrite de potasse à 0,20 pour 1000, puis 8 à 10 gouttes d'acide sulfurique dilué au 1/4.

On agite et on laisse reposer. On peut se rendre compte immédiatement de l'apparition d'une teinte rose qui va s'accroissant, si bien qu'au bout de quelques heures tout le liquide est coloré fortement en rose. (Nous avons eu soin de nous assurer que la peptone servant à préparer les milieux de culture ne renfermait pas spontanément de l'indol.)

Numération. Calculs. — Le nombre de colibacilles est évalué par litre. Il est admis que le tube ou le ballon ensemencé avec la plus petite quantité d'eau et dans lequel s'est développé une culture de colibacille a été ensemencé avec un seul bacille de cette espèce. Par conséquent et dans ces conditions, un calcul très simple suffira pour établir la quantité de colibacilles au litre. Si des cultures de coli ont été obtenues dans les vases ensemencés avec 0 cc. 25 d'eau et plus, tandis que les tubes ensemencés avec moins de 0 cc. 25 restent limpides, on conclut, en divisant 1000 par le coefficient de dilution minima nécessaire pour obtenir une culture de colibacilles soit 0 cc. 25, que l'eau renfermerait 4000 colibacilles par litres.

Recherche des anaérobies. — Procédés suivis en 1913-1914.

Elle a été tentée d'après la méthode de Veillon, employant de la gélose préparée avec de la viande de bœuf qu'on fait macérer dans l'eau pendant 24 à 48 heures et à laquelle on ajoute 2 grammes de glucose et 1 gramme de nitrate de potasse par litre.

Nous nous sommes servi des milieux de cultures

usuels, en tubes et ballons privés d'air par aspiration au moyen de la trompe et déplacement avec le gaz d'éclairage; l'opération s'effectuait de la façon suivante :

Chaque ballon pourvu d'un petit étranglement vers le milieu du col recevait le milieu de culture, puis était bouché avec un morceau de coton placé au-dessus de l'étranglement, et le tout était stérilisé à l'autoclave. Après refroidissement rapide, l'ensemencement de l'eau était fait, le col du ballon était fermé avec un bouchon de caoutchouc pourvu d'une ouverture qui laissait passer un tube de verre en communication avec une trompe à eau; l'air était aspiré et, quand le liquide ne bouillonnait plus, la trompe était arrêtée. Le récipient était alors mis en communication avec une conduite de gaz qui venait chasser les dernières traces d'air, mais qui ne pénétrait dans le ballon qu'après filtration à travers le coton. Une nouvelle aspiration était pratiquée, suivie d'un deuxième jet de gaz, et ce n'est qu'après avoir répété une troisième fois ces opérations que le ballon était fermé au point de l'étranglement avec la flamme d'un Bunsen.

Nous avons encore expérimenté la méthode préconisée par Tissier et Martelly, qui consiste à faire des cultures en bouillon privé d'air avant de pratiquer l'ensemencement en tubes de gélose glucosée; les aérobies ayant été totalement éliminés dans le bouillon, seuls subsistent les anaérobies et quelques facultatifs qui poussent ensuite dans le tube de Veillon.

Anaérobies. — Procédés suivis en 1919.

Cette recherche a été effectuée avec le tube de Vignal : On ensemence deux tubes, l'un avec 1 cc., l'autre avec

2 cc., en utilisant le milieu nutritif au sulfo-indigotate de soude. Après l'ensemencement et le remplissage, les tubes scellés sont abandonnés à la température du laboratoire ou placés à l'étuve entre 18° et 22°.

Les colonies d'anaérobies sont reconnues à la décoloration du sulfo-indigotate de soude, à leur aspect floconneux, etc.

Essai physiologique.

Il s'effectue suivant la méthode de Pouchet et Bonjean : Dans un ballon contenant 10 cc. de bouillon peptoné stérile on ensemence 30 cc. d'eau et on laisse à l'étuve à 37°, pendant 8 jours. On injecte alors cette culture dans le péritoine d'un cobaye à la dose de 1/2 cc. pour 100 grammes du poids de l'animal, puis, chaque jour, on examine l'état général du cobaye, on prend sa température et on recherche s'il ne se produit aucune lésion locale ni aucune déperdition de poids.

ANALYSES

LIMONADES GAZEUSES

PREMIÈRE ANALYSE

Origine..... Vergèze.

Date de l'analyse..... 29 novembre 1913.

Résultats chimiques

Acidité totale rapportée au litre, exprimée en SO^4H^3 .. 2 gr. 49

Acidité fixe après ébullition de 10 minutes — 0 gr. 68

Dosage du glucose existant dans l'échantillon par litre. 65 gr. »

Dosage du sucre de canne. — — — 17 gr. 10

L'édulcoration a été obtenue probablement avec 78 gr. 85 de saccharose par litre, dont 61 gr. 75 ont été intervertis pour donner 65 grammes de glucose et lévulose.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau		{ 325 bactéries
trouvés jusqu'au 15 ^e jour.....	420	{ 165 levures
Liquéfians	20	
Moisissures.....	150	
Nombre d'espèces isolées par cc.	6	{ 5 bactériennes
		{ 1 levure
Colimétrie	Pas de colibacille.	
Anaérobies.....	{	stricts..... 0
		facultatifs. 2 colonies identiques en tubes de Veillon après ensemencement de 2 cc. d'eau.

Parmi les espèces isolées nous avons reconnu et caractérisé les suivantes :

Bacille type *Mesentericus vulgatus* (isolé en bouillon phéniqué à 42°).

Bacille type *Ochraceus* (assez nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus subtilis (isolé en bouillon phéniqué à 42°).

Micrococcus type *Aurantiacus* (nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus anaérobie facultatif (isolé en tube de Veillon).

Levures (nombreuses) isolées sur plaque de gélatine où elles donnent des colonies blanches qui s'étalent à la surface du milieu de culture.

Essai physiologique : L'inoculation au cobaye d'une culture mixte n'a provoqué aucun désordre chez l'animal ; son poids, qui égalait 530 gr. le jour de l'inoculation, s'est abaissé à 515 gr. au bout de 8 jours, puis à 510 gr. après 15 jours, mais est remonté à 525 gr. le 22^e jour.

Pas de réaction locale ; ni abcès, ni hypertrophie ganglionnaire, aucune élévation de température.

DEUXIÈME ANALYSE

Origine..... Bollène.

Date de l'analyse..... 10 janvier 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale rapportée au litre exprimée en SO^4H^2 .. 2 gr. 80

Acidité fixe après ébullition de 10 minutes — 0 gr. 62

Dosage du glucose existant dans l'échantillon par litre. 2 gr. 31

Dosage du sucre de canne — — — 79 gr. 69

L'édulcoration, à la préparation, a été obtenue probablement avec 77 gr. 90 de saccharose par litre.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau
trouvés jusqu'au 17^e jour..... 825
(constitués en majorité par des
levures.)

Liquéfiants 8

Moisissures..... 10

Nombre d'espèces isolées par cc. 7 { 5 bactériennes
2 levures

Colimétrie Pas de colibacille.

stricts 0

Anaérobies..... { facultatifs: 1 colonie en tube de
Veillon après ensemencement de
2 cc. d'eau,

Parmi les espèces isolées nous avons reconnu et caractérisé les suivantes :

Bacillus Aerophilus (nombreux), isolé en plaque de gélatine.

Bacillus Subtilis (isolé en bouillon phéniqué à 42°).

Bacille A (unique, isolé en bouillon phéniqué à 42°, voir Addendum).

Bacille anaérobie facultatif (isolé en tube de Veillon).

Micrococcus Candicans (isolé en plaque de gélatine).

Micrococcus type *Cinnabareus* (Flügge) (peu nombreux), isolé en plaque de gélatine.

Levures blanches étalées à la surface de la gélatine.

Levures grises surtout incluses dans la masse gélatineuse sous forme de petits points gris.

Essai physiologique : 2 cc. 5 d'une culture mixte injectés à un cobaye de 500 grammes n'ont provoqué aucun trouble chez l'animal, pas d'abcès, pas d'élévation de température, pas de variation de poids.

TROISIÈME ANALYSE

Origine Montpellier.

Date de l'analyse..... 30 janvier 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale en SO^4H^2 rapportée au litre..... 2 gr. 55

Acidité fixe après 10 minutes d'ébullition, en SO^4H^2 .. 0 gr. 70

Glucose existant dans l'échantillon par litre 8 gr. 19

Sucre de canne — — — — — 60 gr. 14

L'édulcoration d'un litre de limonade a été obtenue probablement avec 67 gr. 83 de saccharose.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau trouvés jusqu'au 10^e jour..... 2120
(ce chiffre élevé est dû à ce que les bottes de Pétri ont été envahies par une multitude de petites colonies jaunes incluses dans la gélatine et dues à des levures.)

En réalité le nombre des bactéries est de 450

Liquéfians 50

Moisissures.....	50
------------------	----

Nombre d'espèces isolées par cc. 8 { 6 bactériennes
2 levures.

Colimétrie..... Pas de colibacille.

Anaérobies stricts..... 0

Espèces isolées et que nous avons caractérisées :

Bacillus Subtilis, isolé en bouillon phéniqué à 42°.

Bacilles B et C, isolés en plaques de gélatine (Voir Addendum).

Micrococcus rose type *Diplococcus roseus* de Flügge.

Cladothrix Dichotoma (2 colonies isolées sur plaque de gélatine).

Proteus vulgaris, à virulence bien atténuée (1 colonie isolée sur plaque de gélatine).

Levures jaunes, nombreuses, incluses dans la gélatine.

Levures rouges, assez rares, à la surface de la gélatine.

Essai physiologique : Le cobaye injecté n'a présenté aucun changement dans ses habitudes, pas de symptôme d'infection, pas de température.

QUATRIÈME ANALYSE

Origine..... Montpellier.
Date de l'analyse 6 février 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale en SO^4H^2 rapportée au litre.....	2 gr. 85
Acidité fixe — — — après ébullition de 10 min.	0 gr. 62
Sucre interverti existant dans l'échantillon par litre..	1 gr. 47
Sucre de canne — — — — —	66 gr. 56

L'édulcoration de la limonade a été probablement obtenue avec 67 gr. 83 de saccharose par litre.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau	{	294 bactéries
trouvés jusqu'au 10 ^e jour.....		320 { 26 levures
Liquéfiants	15	
Moisissures.....	2	
Nombre d'espèces isolées par cc.	8	{ 5 bactériennes
		{ 3 levures
Colimétrie.....		Pas de colibacille.
Anaérobies stricts par cc.....	0	

Nous avons caractérisé et identifié les espèces suivantes :

Bacillus Aerophilus (assez nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Aurantiacus (assez nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Subtilis (isolé en bouillon phéniqué à 42°).

Bacille C (quelques-uns), isolé sur plaque de gélatine.

Bacille type Luteus sporogenes (peu nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Levures blanches donnant des colonies à bords entiers, à surface convexe unie et brillante.

Levures blanc-grisâtre donnant des colonies à bords dentelés, à surface convexe granuleuse.

Levures rouges.

Essai physiologique : Il a été négatif, le cobaye inoculé n'a présenté aucun trouble, aucune infection.

CINQUIÈME ANALYSE

Origine Pierrelatte.

Date de l'analyse 14 février 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale rapportée au litre, exprimée en SO^4H^2 .	3 gr. 10
Acidité fixe après ébullition de 10 minutes	— 0 gr. 50
Sucre interverti existant dans l'échantillon par litre.	2 gr. 10
Sucre de canne	56 gr. 90

L'édulcoration est due probablement à 58 gr. 90 de saccharose par litre.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau trouvés jusqu'au 12 ^e jour.....	770
Liquéfiantes	20
Moisissures.....	40
Nombre d'espèces isolées par cc.	7 { 5 bactériennes 2 levures
Colimétrie.....	Pas de cobacille.
Anaérobies par cc	0

Espèces isolées et caractérisées :

Bacillus Liquidus (peu nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Aurantiacus (assez nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Aquatilis, isolé sur plaque de gélatine.

* Bacillus Subtilis, isolé en bouillon phéniqué à 42°.

Micrococcus Roseus (rares), isolé sur plaque de gélatine.

Levures blanches.

Levures jaunes.

Essai physiologique : L'inoculation d'une culture mixte au cobaye a été négative.

SIXIÈME ANALYSE

Origine..... Cette.

Date de l'analyse 2 janvier 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale par litre exprimée en SO^4H^2 2 gr. 60

Acidité fixe après ébullition de 10 minutes..... 0 gr. 57

Sucre interverti existant dans l'échantillon par litre... 4 gr. 20

Sucre de canne — — — — — 68 gr. 35

L'édulcoration est due probablement à 72 gr. 34 de saccharose par litre.

* Notre B. subtilis coagule le lait ; il y a d'abord précipitation de la caséine qui est ensuite digérée dans un temps très court. Ce bacille est décrit d'une façon détaillée dans l'Addendum.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau trouvés jusqu'au 11 ^e jour.....	635 dont 200 levures environ
• Liquéfiantes	105
Moisissures.....	200
Nombre d'espèces isolées.....	6 dont 1 levure
Colimétrie.....	Pas de cobacille.
Anaérobies par cc.	0

Espèces isolées et identifiées :

Bacillus type Filiformis (de Tills), rare, isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Subtilis (assez nombreux), isolé en bouillon phéniqué à 42°.

Streptothrix type Færsteri (rare), isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus Roseus, isolé sur plaque de gélatine.

Diplococcus Luteus (assez abondant), isolé sur plaque de gélatine.

Levure jaune.

Essai physiologique : L'injection de 3 cc. 5 d'une culture mixte dans le péritoine d'un cobaye pesant 630 grammes n'a pas paru incommoder l'animal dont le poids n'a subi aucune variation appréciable. Pas d'élévation de température, aucun symptôme d'infection.

SEPTIÈME ANALYSE

Origine..... Montpellier.
Date de l'analyse 15 juin 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale en SO^4H^3 par litre.....	2 gr. 73
Acidité fixe après ébullition de 10 minutes	0 gr. 49
Sucre interverti par litre, existant dans l'échantillon.	1 gr. 98
Sucre de canne — — — — —	63 gr. 13
Sucre total (en saccharose) ayant probablement servi à édulcorer 1 litre de limonade	65 gr. »

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau
trouvés jusqu'au 12^e jour..... 1750

La presque totalité des germes
aérobies est constituée par des
levures ; c'est ainsi que sur 17
colonies isolées sur une plaque de
Pétriensemencée avec 1 cc. d'une
dilution de limonade au 1/100 on
compte 14 colonies de levures et
3 colonies de bactéries.

Liquéfiants 7

Moisissures..... 10

Nombre d'espèces isolées par cc. 6 { 4 bactériennes
2 levures

Colimétrie..... Pas de colibacille.

Anaérobies par cc. 0

Bactéries isolées et identifiées sur plaques de gélatine :

Bacillus Luteus Sporogenes, peu nombreux.
Micrococcus Roseus, peu nombreux.
Micrococcus Aquatilis, peu nombreux.
Micrococcus Luteus, assez abondant.
Levures donnant des colonies blanches à la surface de la gélatine.
Levures donnant de petites colonies jaunes, très nombreuses
inclues dans la masse de la gélatine.

Essai physiologique : Négatif.

HUITIÈME ANALYSE

Origine..... Montpellier.

Date de l'analyse 29 juin 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale par litre en SO^4H^2	2 gr. 85
Acidité fixe après ébullition de 10 minutes.....	0 gr. 48
Sucre interverti par litre existant dans l'échantillon..	1 gr. 50
Saccharose — — — — —	66 gr. 20

L'édulcoration est due probablement à 67 gr. 60 de
saccharose par litre de limonade.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau trouvés jusqu'au 11 ^e jour.....	950
Liquéfiants	125
Moisissures.....	15
Nombre d'espèces isolées par cc.	6 { 4 bactériennes 2 levures
Colimétrie.....	Pas de colibacille.
Anaérobies par cc.	0
Bactéries isolées et identifiées :	

Bacillus Fluorescens Liquefaciens, rare.
Bacillus Aurantiacus, assez abondant.
Micrococcus Aquatilis, assez abondant.
Bacillus Subtilis, isolé en bouillon phéniqué à 42°.
Levures blanches.
Levures rouges.

Essai physiologique : Le cobaye inoculé avec une culture mixte n'a présenté aucune réaction locale et n'a pas paru incommodé.

NEUVIÈME ANALYSE

Date de l'analyse..... 1^{er} juillet 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale en SO^+H^2 par litre.....	2 gr. 70
Acidité fixe après ébullition de 10 minutes	0 gr. 48
Sucre interverti par litre existant dans l'échantillon. .	2 gr. 05
Sucre de canne — — — — —	69 gr. 46

L'édulcoration a été obtenue probablement avec 71 gr. 40 de saccharose par litre.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. d'eau	{ 750 bactéries 2150 levures
trouvés jusqu'au 12 ^e jour.....	
Liquéfiants	50
Moisissures.....	20
Nombre d'espèces isolées par cc.	7 { 5 bactériennes 2 levures
Colimétrie.....	Pas de colibacille.
Anaérobies	0
Bactéries identifiées :	

Bacille type *Ochraceus* (rares), isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Subtilis, isolé en bouillon phéniqué à 42°.

Micrococcus Versicolor, isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus Roseus (peu abondants), sur plaque de gélatine.

Micrococcus Aquatilis (assez nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Levures blanches.

Levures jaunes.

Essai physiologique : Négatif.

DIXIÈME ANALYSE

Origine..... Vergèze.

Date..... 3 juillet 1914.

Résultats chimiques

Acidité totale en SO^4H^2 par litre	2 gr. 90
Acidité fixe après ébullition de 10 minutes.....	0 gr. 53
Glucose par litre existant dans l'échantillon.....	2 gr. 60
Sucre de canne.....	65 gr. 03

L'édulcoration a été obtenue probablement avec 67 gr. 50 de saccharose.

Résultats bactériologiques

Germes aérobies par cc. — Les boîtes de Pétriensemencées avec 1 cc. de limonade, et avec des dilutions au 1/10 et au 1/100 ont été envahies par une multitude de petites colonies jaunes dues à des levures. Le nombre de colonies dues à des bactéries que nous avons pu isoler dans ces conditions est de.. 350 par cc.

Liquéfiants	50
Moisissures.....	120

Nombre d'espèces isolées par cc. 5 { 4 bactériennes
1 levure
Colimétrie..... Pas de colibacille.
Anaérobies 0
Bactéries isolées et identifiées :

Bacille type Ochraceus, isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus Candicans, isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus Aurantiacus, isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Subtilis, isolé en bouillon phéniqué à 42°.

Levures jaunes.

Essai physiologique : Le cobaye inoculé n'a présenté aucun signe d'infection, et n'a subi aucune variation de poids.

EAUX GAZEUSES

Les analyses effectuées sur les eaux gazeuses qui sont livrées à la consommation dans des siphons ont donné des résultats à peu près semblables.

Dans ces eaux nous n'avons pas décelé la présence du colibacille, ni celle d'autres microbes pathogènes ; les bactéries toutes saprophytes, isolées en boîtes de Pétri, sont surtout des bactéries chromogènes présentant des caractères communs que nous décrivons : En général, ces microbes ont une virulence excessivement faible, ils poussent lentement et difficilement sur les milieux usuels en donnant de maigres cultures ; la température optima est celle de 20°, tandis qu'à 37° les colonies n'apparaissent pas ou poussent faiblement.

C'est en boîtes de Pétri où l'eau estensemencée directement à des dilutions variées que les microbes, presque uniquement des bacilles, poussent le mieux, en donnant des colonies caractéristiques de teintes variées ; mais quand on repique ces cultures en bouillon peptoné, gélatine, gélose et lait, les bactéries cultivent mal ou même pas du tout et deviennent alors difficiles à identifier. Le bouillon constitue cependant un milieu favorable où les microbes se développent en 24 ou 48 heures à la tempé-

rature du laboratoire. Sur gélatine en piqûre la culture ne se fait qu'au contact de l'air, tandis que dans le trait sous-jacent ne se développent que de rares colonies ; la culture n'apparaît en surface que le 3^e ou 4^e jour après l'ensemencement et demande parfois 8 jours pour former un enduit caractéristique ; généralement il n'y a pas de liquéfaction et quand elle se produit ce n'est que tardivement pour progresser faiblement.

Sur gélose inclinée après plusieurs larges ensemencements rien ne pousse, même à la température optima. Le lait ne subit aucune modification.

Quant à l'essai physiologique tenté chaque fois par injection au cobaye, il a toujours été négatif.

En somme, ces bactéries chromogènes ont une activité excessivement réduite ; ce sont des microbes abâtardis par un milieu où les conditions de vie leur sont défavorables.

PREMIÈRE ANALYSE

Origine.....	Montpellier.
Date de l'analyse	7 mars 1914.
Germes aérobies par cc. d'eau	960
Liquéfiants	30
Moisissures.....	20
Nombre d'espèces isolées par cc.	5
Colimétrie.....	Pas de colibacille
Anaérobies au cc.....	0

Bactéries isolées et identifiées :

- Bacillus Filiformis (peu nombreux).
- Bacillus Subtilis, isolé à 42° en bouillon phéniqué.
- Bacillus Subflavus, isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus Candicans (assez nombreux), isolé sur gélatine.
Cladothrix Dichotoma, rares colonies sur plaques de gélatine.

Essai physiologique : Négatif, le cobaye injecté n'ayant présenté aucun caractère anormal.

DEUXIÈME ANALYSE

Origine..... Montpellier.

Date de l'analyse..... 12 mars 1914.

Germes aérobies par cc. d'eau..... 826

Liquéfiants..... 10

Moisissures..... 2

Nombre d'espèces isolées par cc. 6

Colimétrie..... 0

Anaérobies au cc..... Pas de colibacille

Espèces isolées et identifiées :

Bacillus Subtilis, isolé en bouillon phéniqué à 42°.

Bacillus Aureus, isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus type Nubilus (Zimmermann), quelques colonies sur plaque.

Bacillus type Implexus (Zimmermann), peu nombreux sur plaque de gélatine.

Micrococcus Versicolor (assez abondant), isolé sur plaque de gélatine.

Cladothrix Dichotoma, quelques colonies sur plaque de gélatine.

Essai physiologique : Négatif.

TROISIÈME ANALYSE

Origine.....	Montpellier.
Date de l'analyse	25 mars 1914.
Gèrmes aérobies par cc. d'eau	1750
Liquéfiants	8
Nombre d'espèces isolées par cc.	5
Colimétrie.....	Pas de colibacille
Anaérobies au cc.....	0

Espèces isolées et identifiées :

Bacillus Aurantiacûs (assez nombreux), sur plaque de gélatine.

Bacillus Fluorescens aureus, peu abondant, sur plaque de gélatine.

Bacille rouge type Rubefaciens (Zimmermann), quelques colonies sur plaque de gélatine.

Bacille analogue au B. Plicatus (Zimmermann), rare, isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus Aquatilis (nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Essai physiologique : Pas d'infection chez le cobaye injecté avec une culture mixte.

QUATRIÈME ANALYSE

Origine.....	Cette.
Date de l'analyse.....	2 avril 1914.
Gèrmes aérobies par cc. d'eau	1450
Liquéfiants	60
Nombre d'espèces isolées par cc.	5
Colimétrie.....	Pas de colibacille
Anaérobies au cc.....	0

Espèces isolées et identifiées :

Bacillus type Rubefaciens, plusieurs colonies sur plaque de gélatine.

Bacillus Subtilis, isolé en bouillon phéniqué à 42°.

Bacillus Aureus, isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus Cremonides (peu nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Micrococcus Candidus (assez nombreux).

Essai physiologique: Pas de réaction locale. Pas de symptôme d'infection chez le cobaye injecté.

CINQUIÈME ANALYSE

Origine..... Bollène.

Date de l'analyse 9 avril 1914.

Germes aérobies par cc. d'eau 773

Liquéfiants 15

Nombre d'espèces isolées par cc. 5

Colimétrie..... Pas de colibacille

Anaérobies au cc..... 0

Bactéries isolées et identifiées:

Bacillus Nubilus (peu nombreux), isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Luteus, isolé sur plaque de gélatine.

Bacillus Aurantiacus (assez nombreux), isolé sur gélatine.

Micrococcus Candidus (assez nombreux), isolé sur gélatine.

Micrococcus Cinnabareus, assez abondant sur gélatine.

Essai physiologique: Une culture mixte n'a provoqué aucun désordre chez le cobaye injecté. Son poids n'a pas varié, il n'a pas présenté d'élévation de température. Pas d'abcès.

En résumé, des analyses effectuées il résulte que, dans les *Limonades examinées*, le colibacille n'a jamais été décelé ; le nombre des germes aérobies est peu élevé, il est constitué par de nombreuses levures et des bactéries qui appartiennent toutes à des espèces banales ; la recherche des anaérobies stricts est demeurée négative ; enfin, l'essai physiologique tenté chaque fois sur le cobaye a démontré l'innocuité des limonades étudiées.

Les *Siphons* ne contiennent pas davantage de colibacille ; leur flore est peu variée et, si le nombre des germes aérobies trouvés est plus élevé que dans les limonades, les bactéries isolées appartiennent encore à des espèces banales et leur vitalité est excessivement affaiblie.

Nous pouvons donc conclure à la potabilité des limonades gazeuses et des siphons.

ADDENDUM

**Espèces non identifiées et espèces connues,
mais à caractères spéciaux.**

Bacille A (isolé au cours de la 2^e analyse)

Caractères microscopiques. — Bâtonnets immobiles de 2 μ sur 0,6 μ de largeur, à extrémités arrondies ; associés souvent par 2, ou disposés en files d'un grand nombre d'éléments jusqu'à 15 ou 20 bâcilles accouplés.

Coloration. — Se colorent bien par les couleurs d'aniline et prennent le Gram.

Cultures. — Le bouillon peptoné est à peine troublé.

Sur gélatine : Pas de liquéfaction ; le long de la piqûre se développent des colonies blanches, tandis qu'à la surface se forme un enduit blanc légèrement jaunâtre.

Sur gélose : La culture apparaît en moins de 24 heures, sous l'aspect d'une large bande blanc terne, à surface légèrement granuleuse ; on dirait une couche de plâtre étalée sur la gélose.

Dans le lait : En 48 heures, commencement de coa-

gulation avec quelques caillots qui flottent dans le liquide ; le 3^e jour, tout le lait est pris en une seule masse surmontée d'un peu de lacto-sérum.

Bacille B (isolé au cours de la 3^e analyse)

Caractères microscopiques. — Ce sont de fins bacilles très courts, des coccobacilles mobiles, à extrémités arrondies, de $1\ \mu$ à $1,5\ \mu$ de long sur $0,5$ à $0,7\ \mu$ de large. Sont disposés par 2 ou en files de 3 à 7 ou 8 éléments, mais aussi en amas provoqués par la juxtaposition de plusieurs chaînes de microbes.

Coloration. — Prennent bien les colorants d'aniline avec Gram positif.

Cultures. — Le bouillon se trouble en moins de 24 h., il se forme ensuite un léger dépôt, pas de voile.

Gélatine. Sur plaque : Apparaissent à la surface de la gélatine sous forme de toutes petites gouttelettes incolores, transparentes. Examinée au microscope, une colonie présente un aspect réniforme et ressemble à un haricot ; elle est constituée par une masse gris clair avec un centre foncé et le tout entouré d'une capsule brune.

Il n'y a pas de liquéfaction.

En piqûre : En 24 heures, le long de la piqûre, nombreuses colonies, puis culture blanche, cireuse, à la surface de la gélatine.

Sur gélose : La culture ne pousse que lentement ; on obtient de petites colonies isolées, pâles, ne formant pas une bande unique.

Sur le lait : Pas de coagulation.

Bacille C (isolé au cours de la 3^e analyse)

Caractères microscopiques. — Bacilles mobiles, 2 μ de long sur 0,8 à 1 μ de large, isolés, par deux et souvent en amas. Ils se colorent bien avec le violet de gentiane et prennent le Gram.

Cultures. — Le *bouillon* présente au bout de 48 heures un trouble léger qui devient ensuite abondant.

Sur gélatine. En plaque : La colonie offre une légère teinte bleue, surtout si l'on observe la plaque par transparence. Examinée au microscope elle présente une partie centrale en forme de disque irrégulier gris jaune et une 2^e zone périphérique, assez mal délimitée, incolore.

En piqure : La gélatine est liquéfiée tardivement. De nombreuses colonies apparaissent le long de la piqure, mais la liquéfaction ne commence que le 4^e ou 5^e jour ; il se forme un petit entonnoir étroit avec dépôt blanc-jaune, le liquide surnageant est clair avec quelques particules jaunes en suspension.

Sur gélose : De nombreuses colonies punctiformes blanches tapissent la surface de la gélose sans former un enduit homogène.

Le lait. — N'est pas modifié.

OBSERVATIONS SUR QUELQUES PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES
DU B. SUBTILIS RENCONTRÉ DANS NOS ESSAIS

Au cours de nos recherches nous avons pu isoler d'une eau gazeuse une variété de B. subtilis présentant certaines propriétés qu'il nous a paru intéressant de signaler : Ce bacille ensemencé dans les milieux de culture usuels (bouillon, plaque de gélatine, tube de gélatine, gélose, pomme de terre) se comporte comme le bacille type, mais il en diffère par son action sur le lait.

Action sur le lait.— D'après Macé, le lait serait coagulé par le B. subtilis : le caillot n'est pas attaqué.

Un autre auteur a constaté que « la caséine, d'un lait ensemencé avec une culture de B. subtilis et mis à 37° quelques heures, subit une modification dans sa constitution intime ; elle ne se coagule plus en une masse compacte comme le lait ordinaire, mais donne au contraire de fins grumeaux très ténus et d'une densité très faible, si bien qu'une partie reste en suspension dans le liquide ou même flotte à la surface du liquide ».

Notre bacille beaucoup plus actif *coagule le lait en quelques heures, le caillot est attaqué ensuite et disparaît dans un temps assez court, que nous avons déterminé* ».

Nous partons d'une culture en bouillon peptoné dont nous ensemençons 1 cc. dans 20 cc. de lait stérilisé et nous portons à l'étuve à 37°. Nous avons au préalable déterminé la quantité de caséine contenue dans le lait en expérience soit 37 grammes par litre.

Il y a d'abord coagulation, puis la digestion commence. Après 14 heures de séjour à l'étuve nous dosons la caséine qui reste dans le lait ensemencé et cela après

nous être assuré que toute la caséine a bien été coagulée : nous trouvons 9 grammes par litre. Après 36 heures, il ne reste plus que des traces de caséine. Donc, en 36 heures, toute la caséine des 20 cc. de lait a disparu, digérée par le microbe.

Dans ces expériences, nous avonsensemencé notre lait avec une culture de *B. subtilis* en bouillon. Si nous nous servons d'une culture en lait, nous constatons qu'il y a bien coagulation en grumeaux assez volumineux, mais il n'y a plus digestion du caséum dans les 36 heures.

Notre bacille sécréterait donc une diastase spéciale, une « caséase » semblable à celle que Duclaux a obtenue des *Tyrothrix*. D'après cet auteur, la caséase, mise en contact avec la caséine du lait qui doit être coagulée par avance, la dissout et il se forme un liquide opalescent essentiellement propre à l'assimilation.

Action sur le lactose.— Nous avons d'autre part suivi l'action sur le lactose à l'aide de la liqueur de Felhing. Sur 45 grammes de lactose existant dans un litre de lait, nous n'en retrouvons que 41 grammes après 14 heures de culture et 38 grammes seulement après 36 heures ; il a donc disparu 13 grammes de sucre de lait.

Nous nous sommes demandé si ces 13 grammes étaient tous passés à l'état d'acide lactique et dans ce but nous avons effectué le dosage de l'acide lactique. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Acide lactique rapporté au litre : 9 grammes.

Or la transformation du lactose en acide lactique se fait dans les proportions indiquées par la formule suivante :



Il a donc disparu 13 grammes de lactose qui ont donné naissance à 9 grammes d'acide lactique, tandis que 4 grammes qui ne se retrouvent pas à ce même état ont pu servir d'aliment au microbe ou sont passés sous une forme indéterminée.

CARACTÈRES DU FILTRAT. — Nous avons étudié ensuite quelques propriétés du filtrat provenant d'une culture en lait. Le filtrat est obtenu en ensemençant 5 cc. de la culture de subtilis en bouillon peptoné, dans 100 cc. de lait stérilisé; on laisse à l'étuve à 37° pendant 36 heures, temps suffisant pour que la digestion de la caséine coagulée soit complète, on filtre sur papier pour éliminer les globules graisseux en suspension, et on passe à la bougie Berkfield.

On obtient un liquide stérile, opalescent et jaunâtre, qui est inactif sur le lait, l'ovalbumine coagulée et la fibrine; par contre il *liquéfie la gélatine et intervertit rapidement le sucre de canne*.

Action sur la gélatine. — Nous avons mis en évidence l'action sur la gélatine de la façon suivante :

Nous faisons une solution de gélatine à 10 p. 100; à 3 cc. de cette gélatine liquide nous ajoutons 1 cc. du filtrat et nous portons à l'étuve à 37° avec un témoin. Une heure après nous retirons les deux tubes de l'étuve et nous les plaçons sous un courant d'eau froide. Le tube ensemenché avec le filtrat ne se reprend plus, le témoin se solidifie en quelques minutes. La liquéfaction de la gélatine est donc totale si on espace une heure, à l'étuve à 37°, 1 cc. de filtrat et 3 cc. d'une solution de gélatine à 10 p. 100.

Nous avons ensuite déterminé l'intensité de cette digestion. Dans une série de dix tubes nous disposons :

0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 3, et jusqu'à 1 cc. du filtrat. Nous ajoutons à chaque tube 3 cc. de la solution de gélatine à 10 p. 100 et nous laissons à l'étuve à 37° pendant une heure. Nous retirons les tubes que nous disposons sous un courant d'eau froide. Nous constatons qu'au bout de quelques instants les 6 premiers tubes se solidifient entièrement, dans le 7^e les deux tiers de la gélatine se reprennent, un quart dans le 8^e et un mince culot tapisse le fond du 9^e, la liquéfaction est totale dans le 10^e.

Notre filtrat contient donc un ferment peptolytique, car cette liquéfaction de la gélatine est une véritable peptonisation ; son action commence déjà à s'effectuer si on met en présence 3 cc. du filtrat et 0 cc. 7 de gélatine liquide à 10 p. 100.

Action sur le saccharose. — Le filtrat du B. subtilis contient une sucrase capable d'intervertir rapidement le sucre de canne ; nous avons mis son action en évidence de la façon suivante :

Dans un tube nous plaçons 1 cc. du filtrat et 3 cc. d'une solution de sucre à 5 p. 100 ; nous mettons à l'étuve à 37° ainsi qu'un tube témoin contenant 3 cc. de la solution de sucre et 1 cc. d'eau distillée. Deux heures après les tubes sont retirés de l'étuve ; nous traitons 1 cc. de liqueur de Fehling par 1 cc. de la liqueur sucrée ensemencée et nous constatons après avoir chauffé le mélange qu'il y a réduction d'oxyde cuivrique avec dépôt d'oxyde cuivreux.

Le témoin ne réduit pas.

Vitesse de l'intervention. — Pour mesurer la vitesse d'intervention, nous disposons dans une série de 10 tubes :

0 cc. 1, 0 cc. 2, 0 cc. 3 jusqu'à 1 cc. du filtrat et nous

ajoutons à chacun 3 cc. solution de saccharose à 5 %, nous laissons pendant une heure à l'étuve à 37°, après ce temps la liqueur de Fehling est réduite dans tous les tubes. La transformation de la molécule de saccharose en deux molécules de glucose et lévulose se fait donc déjà à la dose de 0 cc. 1 du filtrat pour 3 cc. de solution sucrée après une heure de contact.

Quant à la quantité de sucre interverti dans une heure, nous nous servons pour la déterminer de la dose minima de filtrat précédemment employée.

La solution obtenue en dissolvant 5 grammes de sucre du commerce dans 100 cc. d'eau distillée est d'abord dosée exactement. On obtient :

Saccharose pur dans 100 cc. de la solution aqueuse
= 4 gr. 08.

A 60 cc. de cette solution nous ajoutons 2 cc. de filtrat et nous laissons une heure à l'étuve à 37°.

Nous dosons alors la quantité de sucre interverti produite et nous trouvons :

Glucose des 60 cc. de la solution rapportés à 100 cc.
= 0 gr. 128.

Ce glucose provient de la transformation d'une quantité de saccharose qui, rapportée à 100 cc. = 0 gr. 120. Il y a donc eu, dans une solution exactement titrée à 4 gr. 08 pour 100 cc., interversion de 0 gr. 120 de saccharose.

En résumé, la race de *B. subtilis* que nous avons étudiée se fait remarquer par sa grande **activité protéolytique**. Elle sécrète une **caséase** qui digère rapidement et complètement la caséine du lait ; elle produit, en outre, une **sucrease** très active sur le sucre de canne, c'est enfin un **ferment lactique** assez puissant.

ETUDE DU B. COLI ET DE L'EBERTII DANS LES LIMONADES

Il nous a paru intéressant de déterminer expérimentalement la façon dont se comporteraient le Colibacille et l'Eberthensemencés dans les limonades. Nous avons suivi leur mode d'évolution dans une de ces boissons stérilisée où, sans être gênés par la présence d'autres microbes, ils pouvaient se développer suivant les conditions offertes par un tel milieu.

Mais la concurrence vitale ne peut être supprimée que pour les besoins d'une étude expérimentale; dans la réalité nous devons en tenir compte puisque les limonades que nous livre le commerce ne sont pas aseptiques mais possèdent une flore caractéristique et assez variée; il était utile de mettre les deux bacilles pathogènes Coli et Eberth en présence des hôtes habituels des boissons gazeuses pour connaître le sort qui leur était réservé; plus résistants, plus forts, survivraient-ils ou devraient-ils céder le pas aux saprophytes pour disparaître peu à peu ou même s'éteindre complètement?

Les travaux d'un certain nombre de bactériologues renseignent déjà sur les conditions de vie des deux bac-

téries pathogènes qui nous occupent, lorsqu'elles sont ensemencées dans des eaux stériles et dans des eaux ordinaires ; les résultats obtenus, il est vrai, n'ont pas toujours été concordants : cela tient aux variations du degré de vitalité des microbes étudiés, à la nature des espèces qui se trouvaient dans les eaux ensemencées, à la composition de ces eaux, à leur température, enfin à des influences particulières et non définies.

Les eaux de boissons stérilisées ont été étudiées par de nombreux auteurs. Nous résumons les résultats obtenus dans leurs recherches :

WOLFHUGEL et RIEDEL (1886) ont observé dans une eau de rivière stérilisée et maintenue à 16° que le B. d'Eberth qu'ils y avaient ensemencé se multipliait pendant les premiers jours, puis diminuait de nombre pour disparaître complètement au bout d'un mois.

STRAUSS et DUBARRY (1889) n'ont vu disparaître le même microbe qu'au bout de 81 jours dans une eau très riche en matières organiques et après 43 jours dans une autre eau où la quantité de matières organiques était moindre.

Quant à CONRADI (1904), il l'a retrouvé vivant après 420 à 499 jours. Les choses se passent de la même façon pour le coli que VINCENT (1905) a retrouvé vivant après 52 jours dans de l'eau de Seine stérilisée.

Dans l'eau distillée stérilisée, la disparition des deux microbes a lieu dans des délais variables.

VINCENT (1905), après un ensemencement de coli dans le milieu indiqué, comptait 31.200 colonies au cc. ; il en trouvait 12.650 le premier jour, 3.200 le deuxième jour, 60 seulement le sixième jour et zéro le septième jour.

WOLFHUGEL et RIEDEL (1886) ne trouvaient plus que quelques bacilles après 20 jours d'ensemencement.

WHEELER (1906) considère que les eaux riches en matières organiques constituent un terrain beaucoup plus favorable pour le développement de l'Eberth que les eaux pures, stérilisées, pauvres en matières organiques.

Tandis que pour STRAUSS et DUBARRY (1889) qui n'ont vu disparaître le B. typhique dans une eau distillée stérile que le 69^e jour, les microbes vivaient aussi longtemps dans l'eau distillée et stérilisée que dans les eaux de rivière riches en matières organiques et également stérilisées. Pour eux, la composition chimique des eaux n'a aucune influence appréciable sur la durée de la vie des microbes pathogènes, et ils pensent que les eaux chimiquement les plus pures, si elles viennent à être contaminées par des microbes, n'offrent pas plus de garanties d'innocuité que les eaux les plus chargées en matières organiques et inorganiques.

Dans les eaux ordinaires non stérilisées telles qu'on les trouve dans la nature, les bacilles pathogènes, en présence des autres microbes, sont soumis à la concurrence vitale, et de cette lutte pour l'existence ils ne peuvent sortir vainqueurs que s'ils sont les plus forts et les plus résistants. Nous résumons ici les résultats des expériences obtenues par les savants qui ont étudié spécialement la vie des bactéries pathogènes dans les eaux ordinaires.

KARLINSKI (1889), dans ses nombreuses recherches avec le B. d'Eberth, a toujours obtenu des résultats concordants. Ayantensemencé ce microbe dans l'eau de source maintenue à la température de 8°, il obtenait les résultats suivants :

B. d'Eberth :

au début	après 1 jour	2 jours	3 jours	4 jours	5 jours	6 jours
26.000	21.000	14.000	6.100	2.000	641	0

Il y avait eu donc disparition complète de l'espèce mise en expérience, tandis que les microbes saprophytes s'étaient multipliés considérablement, profitant de l'augmentation des matières nutritives de l'eau apportées par les cadavres des bacilles tués.

En opérant sur l'eau d'une citerne préalablement nettoyée, le même auteur (1890) a observé la disparition du bacille typhique dans l'espace de 12 jours ; la citerne, qui contenait 3 hectolitres d'eau de pluie, recevait 150 cc. de selles typhiques très riches en bacilles ; des prélèvements faits journellement permettaient de suivre la disparition progressive du microbe ensemençé, laquelle était complète le 12^e jour, tandis que les autres espèces avaient augmenté de nombre dans des proportions élevées.

Ces résultats étaient confirmés par une autre expérience que KARLINSKI (1889) faisait sur l'eau d'un puits infecté avec 5 litres d'une culture en bouillon contenant 72 millions de bacilles par centimètre cube. La numération des colonies en plaques de gélatine faite après un jour lui indiquait 130.000 B. typhiques ; au bout de 7 jours il n'en décelait plus que 200, et il constatait l'absence du microbe pathogène au bout de 14 jours.

HUPPE (1887), dans ses expériences, a pu observer le développement considérable des bactéries banales, tandis que le bacille typhique tendait à disparaître assez rapidement, puisque son nombre passait de 1.600 au début, à 70 le vingtième jour.

HOFFMAN (1905) a retrouvé le même bacille, deux mois après un ensemencement dans l'eau d'un récipient riche

en microbes banaux, et FRANKLAND (1895) ne l'a vu disparaître dans l'eau de la Tamise qu'au bout de 2 à 5 semaines.

MACÉ (1913, p. 781), au contraire, a constaté un développement abondant du bacille mis en expérience, au détriment des autres microbes; il écrit : « Dans l'échantillon conservé en flacon bouché, j'ai vu disparaître en grande partie les rares espèces saprophytes après un mois; le *B. typhique* restait presque seul au bout de deux mois, puis est devenu très rare, mais n'a disparu que vers le sixième mois ».

En résumé, on a pu conclure de toutes ces recherches que, dans l'eau ordinaire, le bacille d'Eberth diminue assez rapidement de nombre, mais disparaît dans un temps variable ordinairement assez long.

Pour le colibacille, VINCENT (1905), qui a étudié la vitalité de ce microbe dans l'eau naturelle de l'Oise, de la Seine et de la Marne, où il l'ensemait à de fréquentes reprises, a constaté qu'il disparaissait dans un délai de 6 à 8 jours; dans l'eau de Seine, il comptait 44.000 colonies par cc. après l'infection, 118 seulement le 5^e jour et zéro le 7^e jour. Il pensait que cette disparition était non seulement la conséquence de la concurrence vitale des autres bactéries renfermées dans l'eau, mais encore de l'épuisement des matières nutritives contenues dans cette eau, et il concluait en ajoutant que « le *B. coli* ne paraît pas vivre le plus souvent dans les eaux au delà de 1 à 2 semaines, exceptionnellement il y persiste plus longtemps ».

Or, récemment, TEISSIER et E. COUVREUR (1919) ont signalé que le colibacille avait été retrouvé, avec toute sa vitalité, dans des échantillons d'eau recueillis depuis une vingtaine d'années et gardés à l'obscurité, en flacons

bouchés hermétiquement ; les autres microbes, qui constituent la flore habituelle des eaux, avaient disparu.

RECHERCHES EFFECTUÉES SUR LES LIMONADES (1)

C'est toujours la vitalité de l'Eberth et du Coli que nous avons étudiée, mais dans le cas spécial qui nous intéresse ce sont des eaux riches en éléments nutritifs propres à faciliter le développement des deux microbes pathogènes, tandis que d'autres conditions semblent devoir l'annihiler. Nos expériences ont porté sur deux catégories d'échantillons de limonades en même temps que sur un liquide témoin :

1° Sur des limonades ordinaires, telles que les livre le commerce.

2° Sur des limonades stériles, privées de leur flore habituelle par filtration à la bougie.

(Nous n'avons pas employé pour cette stérilisation la chaleur sous pression afin d'éviter autant que possible toute modification dans la composition du liquide ; les filtrats étaient reçus dans des ballons aseptiques et bouchés.)

3° Sur du sérum physiologique préparé avec de l'eau distillée stérilisée, pris comme témoin.

Dans chaque liquide nous ensemencions 1 cc. d'une émulsion de B. d'Eberth obtenue en diluant dans de l'eau distillée stérile une ose de culture sur gélose dudit microbe ; nous opérions de même pour l'ensemencement du B. coli dans trois autres échantillons et nous con-

(1) Recherches effectuées en 1914.

servions tous ces liquides infectés à la température du laboratoire, température oscillant entre 18° et 20°.

La numération était faite de suite après l'ensemencement, puis périodiquement pour suivre régulièrement l'évolution des bactéries ; nous opérons d'après la méthode des plaques de gélatine, sur lesquelles nous obtenions les colonies caractéristiques du Coli et d'ordinaire celles plus caractéristiques encore, en glacier, de l'Eberth. Nous faisons l'identification des deux microbes cités au microscope et par leurs cultures sur les divers milieux biologiques.

Nos recherches qui ont porté sur toute une série d'échantillons nous ont amené aux conclusions suivantes :

1° Dans les limonades ordinaires le B. d'Eberth diminue rapidement de nombre immédiatement après son ensemencement.

Après l'ensemencement 14.700 bacilles d'Eberth par cc.

Au bout de	5 jours	10.500	—	—	—
—	10 jours	1.100	—	—	—
—	15 jours	750	—	—	—
—	50 jours	10	—	—	—

La disparition totale du B. d'Eberth exigerait donc dans ces conditions un temps assez long.

Le colibacille se comporte d'une façon analogue.

Après l'ensemencement 19000 B. coli par cc.

Au bout de	5 jours	11.300
—	10 jours	1.200
—	15 jours	580
—	50 jours	15

Donc, si la diminution est assez rapide, la disparition totale n'a lieu qu'à échéance assez longue, sensiblement comme pour le B. d'Eberth.

2° Dans les limonades stériles le nombre de B. d'Eberth s'est d'abord accru dans les cinq premiers jours, quelquefois jusqu'au dixième jour, mais il a ensuite diminué très rapidement pour tendre vers zéro.

Au début	20.000	bacilles d'Eberth	par cc.
Au bout de 5 jours	230.000	—	—
— 10 jours	125.000	—	—
— 15 jours	72.000	—	—
— 50 jours	<100	—	—

Le colibacille largement ensemencé a donné les résultats suivants :

Après l'ensemencement	75.000	colibacilles	par cc.
Au bout de 5 jours	245.000	—	—
— 10 jours	160.000	—	—
— 15 jours	38.000	—	—
— 50 jours	0	—	—

3° Dans le sérum physiologique stérilisé nous avons observé une diminution rapide du colibacille qui disparaissait au bout de 10 jours.

Après ensemencement	17.000	coli	par cc.
Au bout de 5 jours	200	—	—
— 10 jours	0	—	—

CONCLUSIONS.— Il résulte de ces expériences que si le Colibacille et l'Eberth disparaissent lentement de la limonade, ils trouvent, dans les substances hydrocarbonées qui leur sont données, un aliment et un moyen de résistance. Les résultats des essais sur limonade filtrée sont à rapprocher de ceux qui ont déjà été observés en opérant sur de l'eau ordinaire ou distillée stérile.

Mais ces essais étaient effectués en utilisant du B. d'Eberth et du Colibacille *cultivés*, leur résistance et leur vitalité pouvaient être modifiés par de nombreux passages

sur les milieux artificiels. D'autre part, la limonade stérilisée perdait pendant la filtration servant à sa stérilisation la majeure partie de son CO_2 dont l'action antiseptique était annihilée ; de plus, les deux bacilles étudiés n'étaient pas en concurrence avec d'autres espèces microbiennes ; enfin, les quantités introduites 15 à 75 millions par litre ne sont guère en rapport avec la teneur en B. d'Eberth et en Colibacilles que l'on observe le plus souvent dans l'eau potable. Ne pouvant exercer un contrôle en utilisant le B. d'Eberth, vivant normalement dans l'eau habituellement utilisée pour préparer les limonades sur lesquelles portaient nos expériences, nous nous sommes adressé au Colibacille, plus facile à isoler et à caractériser ; il est, d'autre part, d'une façon continue assez abondant dans l'eau de Montpellier, pour que nos recherches en aient été facilitées (1).

L'eau de Montpellier contient en effet fréquemment du colibacille, en quantité parfois très élevée, surtout après les périodes de pluies ; cette eau est utilisée par les fabricants de limonades de la ville, pour préparer leurs boissons gazeuses, après filtration il est vrai, mais, même après son passage à travers le filtre dont dispose l'usine, l'eau contient du colibacille, nous l'avons constaté à plusieurs reprises, soit parce que le filtre est insuffisamment nettoyé ou parce que mal entretenu il est détérioré.

En même temps, le filtre pouvait éliminer certains germes susceptibles d'influencer l'évolution du colibacille, aussi pour ces recherches avons-nous préparé chez un fabricant, avec l'eau non filtrée puis avec l'eau filtrée :

(1) Recherches effectuées en 1919.

des limonades non édulcorées, gazées

— — — — — édulcorés, non gazées

— — — — — édulcorées et gazées.

Nous avons alors pratiqué sur les eaux employées et sur des limonades obtenues avec elles une rapide analyse chimique, des analyses bactériologiques 3 heures, 8 jours et 15 jours après la préparation de ces limonades. Nous avons obtenu les résultats suivants :

Composition chimique de l'eau de Montpellier non filtrée

Degré hydrotimétrique total	20
Degré hydrotimétrique permanent.	7
Chlorures (exprimés en NaCl)	0 gr. 04680
Matières organiques (O absorbé en milieu alcalin)	0 gr. 002
Nitrites	Très légères traces
Ammoniaque	0
Phosphates	0

L'eau filtrée présentait la même composition avec cette différence que la quantité de matières organiques était réduite à 0 milligr. 8.

Composition chimique des Limonades préparées avec ces eaux

Acidité totale en SO_4H^2 par litre	3 gr. 18
Acidité fixe après ébullition de 10 minutes	0 gr. 588
Saccharose par litre	37 gr. 80
Sucre interverti	1 gr. 05
Saccharine	présence

Pour un essai préliminaire, nous avons dénombré le colibacille dans les 4 échantillons indiqués ci-dessous,

et cela 3 heures après leur préparation et leur prélèvement.

Eau non filtrée	Eau filtrée	Limonade non filtrée	Limonade filtrée
Colibacilles par litre			
2000	1000	500	200

La présence du coli est donc certaine dans tous les échantillons ; la filtration réalisée par l'usine a des effets médiocres.

Nous avons poussé plus loin ces essais et nous avons réuni dans les tableaux qui suivent les résultats obtenus :

Eau et Limonades non filtrées

TABEAU I

		3 heures après la fabrication	Après 8 jours	Après 15 jours
Eau ordinaire — (non filtrée)	Colibacilles par litre.....	100	4000	50
	Germes aérobies par cc.	900	Innombrables.	>45.000 au 5 ^e jour de l'en- semencem ^t
	Liquéfiants par cent. cube....	150	Très nombreux	2.000 au 5 ^e jour
	Moisissures p. cc	"	"	"
Limnade gazée à 4 atmosphères — (non filtrée)	Colibacilles par litre.....	50	100	0
	Germes aérobies par cc.	870	92	2.600
	Liquéfiants par cent. cube	125	5	150 au 6 ^e jour
	Moisissures p. cc	0	0	"
Limnade non gazée édulcorée — (non filtrée)	Colibacilles par litre.....	50	0	0
	Germes aérobies par cc.	2650	60.000	320.000
	Liquéfiants par cent. cube	200	80	215
	Moisissures p. cc	"	325	800

En ce qui concerne la limnade non gazée édulcorée, nous avons contrôlé notre premier résultat par une recherche sur un deuxième échantillon préparé à plusieurs jours d'intervalle qui a confirmé en tous points la première :

		3 heures après la fabrication	Après 8 jours	Après 15 jours
Limonade non gazée édulcorée — (non filtrée)	Colibacilles par litre	1000	0	0
	Germes aérobies par cc.	3180	> 100.000	> 140.000
	Liquéfiants par cent. cube	10	0	0
	Moisissures p. cc	40	20	100

Eau et Limonade non filtrées

TABLEAU II

	Le jour de la fabrication	Après 8 jours
<i>Eau ordinaire :</i>		
Colibacilles par litre	2.000	4.000
Germes aérobies par cc.	3.900 au 5 ^e jour	17.000 au 5 ^e jour
Liquéfiants par cc.	Liquéfaction des	4.600 au 4 ^e jour
Moisissures par cc.	plaques de Pétri	»
<i>Limonade gazée sucrée :</i>		
Colibacilles par litre	1.000	0
Germes aérobies par cc.	6.300 dont 700 bactéries	2.150
Liquéfiants par cc.	30	10
Moisissures par cc.	10	20

Eau et Limonades filtrées (au filtre de l'usine)

TABLEAU III

	Le jour de la fabrication	Après 8 jours
<i>Eau filtrée :</i>		
Colibacilles par litre.....	4.000	20
Germes aérobies par cc.	600	47.000
Liquéfians par cc.	20	nombreux fluorescens
Moisissures par cc.	100	liquefaciens 800
<i>Limonade gazée édulcorée :</i>		
Colibacilles par litre.....	500	0
Germes aérobies par cc.	2.650	1.550
Liquéfians par cc.	0	Levures en presque totalité 0
Moisissures par cc.	50	60
<i>Limonade non gazée édulcorée :</i>		
Colibacilles par litre.....	200	0
Germes aérobies par cc.	3.000	21.600
Liquéfians par cc.	0	0
Moisissures par cc.	10	150

Interprétation des résultats.

L'examen des tableaux I et II montre que l'eau ordinaire non filtrée permettait au colibacille de se développer abondamment pendant la première semaine ; mais,

en même temps, les germes aérobies prenaient une extension considérable, les liquéfiant en particulier atteignaient un chiffre fort élevé, puisqu'en 15 jours ils passaient de 150 à 2.000, chiffre d'ailleurs inférieur à la réalité, car la numération était rendue impossible dès le 5^e jour à cause de la liquéfaction totale de la gélatine. Et somme toute, dans la concurrence vitale qui sévit là comme ailleurs, le coli a paru devoir céder le pas aux autres espèces de l'eau, tout en résistant suffisamment pour être décelé au bout de 15 jours.

Dans l'eau simplement gazée et non édulcorée, le coli ne semble pas avoir été incommodé par l'acide carbonique sous pression, du moins pendant les huit premiers jours, tandis que les germes aérobies et les liquéfiant décroissaient fortement pour se multiplier ensuite au bout de quinze jours dans des proportions qui n'étaient toutefois nullement comparables à celles observées dans l'eau ordinaire; le colibacille, lui, avait disparu le 15^e jour. Il semble donc que l'acide et la pression agissant simultanément, tout en empêchant ou en tout cas retardant le développement des germes aérobies, ne paraissent pas avoir une action énergique sur le B. coli, dont le chiffre peut passer de 50 à 100 au bout de 8 jours, pour disparaître, il est vrai, au 15^e jour.

La limonade non gazée, édulcorée avec du sirop acidifié à l'acide citrique ou tartrique, de par sa richesse en matières organiques, semblait devoir être un milieu nutritif essentiellement favorable au coli. Or les deux essais effectués avec ce milieu concordent pour montrer la disparition du germe que l'on ne retrouve plus après 8 jours, alors que le premier échantillon contenait le jour de la fabrication 50 coli par litre et que le deuxième en possédait 1000. Mais, le sucre constituant un

aliment de choix, les levures se sont multipliées dans d'énormes proportions, car les 320.000, 140.000 germes aérobies que l'on décèle le 15^e jour sont presque en totalité constitués par des levures. Sauf dans le premier essai du tableau I où les liquéfiant persistaient, dans les trois autres essais ils ont disparu entièrement après une semaine ou ont diminué sensiblement de nombre, passant de 30 à 10 comme le montre le tableau II.

Il est donc permis de tirer de ces essais deux conclusions intéressantes : 1^o C'est que les acides citrique et tartrique employés pour acidifier le sirop ont un pouvoir bactéricide suffisamment intense pour tuer en moins de 8 jours le colibacille existant dans une limonade préparée avec une eau contaminée.

2^o La deuxième constatation intéressante est fournie par ce fait que la richesse d'un milieu en matières organiques, même en proportions élevées, ne constitue pas une condition suffisante pour permettre le développement du *B. coli*.

Enfin dans une *limonade gazée et sucrée* non seulement le colibacille disparaît en moins de 8 jours, mais le nombre de germes aérobies diminue, et, comme ces germes sont constitués en majorité par des levures, on peut en déduire que la pression associée à l'acide carbonique a une action néfaste pour ces levures, qui non seulement ne peuvent plus multiplier, mais diminuent de nombre. Il en est de même pour les liquéfiant dont le développement est arrêté et qui tendent à disparaître ; c'est ainsi que leur nombre passe de 30 à 10, après une semaine, dans une limonade ordinaire, tandis que dans l'eau qui a servi à fabriquer cette même limonade on en retrouve 4.600 au bout du même laps de temps.

En résumé, de l'ensemble des recherches nous concluons que les limonades constituent un milieu défavorable pour le colibacille, qui disparaît dans un délai inférieur à huit jours, alors même que l'eau de préparation des boissons gazeuses était naturellement fortement contaminée.

Cette action bactéricide doit être attribuée aux acides citrique et tartrique du sirop qui a servi à édulcorer les limonades.

La pression et l'acide carbonique associés peuvent concourir à la disparition du coli mais faiblement et à échéance plus longue, leur action étant beaucoup plus nette sur les germes aérobies dont le développement est enrayé partiellement ; les bactéries deviennent peu nombreuses et les levures ne peuvent plus se multiplier abondamment comme dans la limonade sucrée mais non gazée.

Enfin, si nous comparons les résultats avec ceux obtenus précédemment avec les cultures, nous constatons que la disparition du colibacille, dans les limonades où il se trouve normalement, est beaucoup plus rapide que lorsqu'on infecte ces mêmes limonades avec un bacille provenant d'un milieu de culture. Et comme pratiquement l'infection des limonades à dose massive par du coli cultivé n'est pas à craindre dans la vie courante, on peut admettre que ce germe au bout de huit jours a disparu de ces boissons gazeuses.

CONCLUSIONS

Les résultats de notre travail intéressent surtout l'hygiène :

1° Ils montrent que la flore microbienne des limonades est relativement peu élevée mais assez variée, chaque échantillon renfermant en moyenne quatre ou cinq espèces de bactéries et un nombre de microbes qui, si l'on se rapporte au tableau de Miquel, permet de classer ces boissons dans les eaux pures. Cette appréciation est confirmée par l'absence du colibacille et de tout microbe pathogène virulent, ainsi que par les résultats négatifs obtenus dans l'essai physiologique.

2° La potabilité subsiste pour les limonades d'été, les analyses ayant démontré qu'à l'époque des grosses chaleurs le nombre des bactéries n'augmente pas et que la flore est encore constituée par des espèces saprophytes.

3° Les eaux gazeuses, livrées en siphons, ont donné des résultats identiques ; ce sont des eaux potables, riches surtout en microbes chromogènes banaux dont la vitalité est excessivement affaiblie, sans doute par suite de conditions de vie défectueuses dans un milieu défavorable.

4° Enfin si les espèces qui sont le plus à redouter, le colibacille et le B. d'Eberth, viennent à pénétrer dans les boissons gazeuses, elles s'y trouvent dans un milieu défavorable et leur nombre diminue très rapidement pour disparaître dans un court délai ; dans nos essais expérimentaux, les bacilles étudiés ont cependant subsisté pendant un temps assez long, mais nous nous étions placé dans des conditions spéciales qui s'éloignaient de la réalité.

Pratiquement il est donc indispensable que certaines précautions soient prises dans la préparation industrielle des eaux et limonades gazeuses :

1° Que toutes les eaux employées soient filtrées soigneusement, et pour obtenir ce résultat il est nécessaire que les filtres soient en bon état et nettoyés périodiquement.

2° Que le réservoir d'eau filtrée, adjoint au saturateur, soit toujours pourvu d'un couvercle pour éviter la contamination par les poussières atmosphériques de l'eau qui vient d'être filtrée.

3° Que l'eau des laveurs et du gazomètre soit changée assez fréquemment.

4° Que les flacons destinés à recevoir les boissons soient soigneusement lavés et rincés avec de l'eau stérile.

Or les fabriques d'eaux gazeuses sont soumises à l'inspection des pharmaciens ; les inspecteurs, qui s'occupent surtout du plomb qui pourrait faire partie de la tuyauterie, devraient attacher une importance aussi grande à surveiller l'épuration biologique de l'eau, en constatant si les précautions que nous avons indiquées sont bien prises par le fabricant.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ABBOT. — Medical News, XLVIII, p. 120, 1866, d'après Miquel et Cambier. *Traité de Bactériologie*, p. 94, 1902.
- ALTANA. — Sulla azione tossica della anidride carbonica sui microorganismi (Rev. d'Igiene di sanit. publ., p. 293, 1907).
- ARSONVAL (D') et CHARRIN. — Pression et microbes (Société de Biologie, série 9, t. V, p. 352, 1893).
- BESSON (A.). — Technique micobiologique et sérothérapique, 5^e édition (Baillière, édit., 1911).
- CONRADI. — Ueber die Lebensdauer pathogener Bacterien im Wasser (Centralbl. für Bakt. 1. Abth orig., XXXVI, p. 203, 1904).
- DOPTER et SACQUEPÉE. — Précis de Bactériologie (Baillière, édit., 1914).
- FRANKLAND. — Ueber das Verhalten des Typhusbacillus und des Bacillus coli communis im Trinkwasser (Zeitschw. für Hygiene, XIX, 1895), d'après Macé, *Traité de Bactério.*, p. 782, 1913.
- FRAENKEL. — Die Einwirkung der Kohlensäure auf die Lebensthäugkeit der Microorganismen (Zeitschrift für Hygiene, V, p. 332, 1888), d'après Miquel et Cambier, *Traité de Bactériol.*, p. 44, 1902.
- LE HÉRISSEY. — De l'interversion du sucre de canne dans quelques sirops acides (Journal de pharmacie et de chimie, t. I, p. 359, 1895).

- HOFFMAN. — Untersuchungen über Lebensdauer von Typhusbazillen im Aquarium-Wasser (Arch. für Hyg., t. II, p. 208, 1905, d'après Macé, Traité de Bactério., p. 109, 1913).
- KARLINSKI. — Ueber das Verhalten einiger pathogener Bacterien im Trinkwasser (Arch. für Hygiene, IX, 1889), d'après G. Roux. Précis d'analyse microbiologique des eaux, p. 109. Bailliére, édit., 1892.
- Ein Beitrag zur Kenntniss des Verhaltens des Typhusbacillus und Trinkwasser (Arch. für Hygiene, X, p. 464, 1890, d'après G. Roux, p. 110).
- KITASATO. — Zeitschrift für Hygiene, t. III, p. 404, 1888, d'après Miquel et Cambier. Traité de Bactériol., p. 94, 1902.
- MACÉ (E.). — Traité pratique de bactériologie, 3^e édit. (Bailliére, édit., 1913).
- MIQUEL et CAMBIER. — Traité de bactériologie pure et appliquée (Masson, édit., 1902).
- NICOLLE. — Action du B. subtilis sur diverses bactéries (Annales de l'Institut Pasteur, t. XXI, p. 613, 1907).
- ROUX (G.). — Précis d'analyse microbiologique des eaux (Bailliére, édit., 1892).
- REUBEN L. KAHN. — Journ. of bacter., nov. 1918.
- STRAUSS et DUBARRY. — Recherches sur la durée de la vie des micro-organismes pathogènes dans l'eau (Archives de médecine expér., t. I, p. 5, 1889).
- TEISSIER et COUVREUR. — Sur la survivance dans les eaux du colibacille (C. R. Société de biologie, t. LXXXII, p. 357, 1909. — Bulletin de l'Institut Pasteur, t. XVII, p. 523, 30 août 1919).
- TEISSIER et MARTELLY. — Recherches sur la putréfaction de la viande de boucherie (Annales de l'Institut Pasteur, t. XVI, p. 865).
- TRILLIAT et SANTON. — Dosage de la matière albuminoïde du lait (Annales de l'Institut Pasteur, t. XX, p. 991).
- VINCENT. — Sur la signification du B. coli dans les eaux potables (Annales de l'Institut Pasteur, p. 233, 1905).
- Recherches sur les microbes anaérobies des eaux (Annales de l'Institut Pasteur, t. XXI, p. 62, 1907).

WHEELER. — The viability of *B. typhosus* under various conditions (Journ. of med. research, XV, p. 269, 1906), d'après Macé, *Traité de Bactériol.*, p. 108, 1913.

WOLFHÜGEL et RIEDEL. — Die Versuchung des Bacterien im Wasser Arbeiten aus dem kaiserlichen Gesundheitsante, I, p. 455, 1886).

WILLIERS, COLIN et FAYOLLE. — *Traité des falsifications et altérations des substances alimentaires* (Octave Doin, édit., 1911).

VU ET BON A IMPRIMER :

Montpellier, le 2 décembre 1919.

Le Président de la thèse,

ASTRUC.

VU ET APPROUVÉ :

Montpellier, le 2 décembre 1919.

Pour le Directeur de l'École,

L'Assesseur délégué,

FONZES-DIACON.

Vu et permis d'imprimer :

Montpellier, le 2 décembre 1919.

Le Recteur,

Jules COULET.

